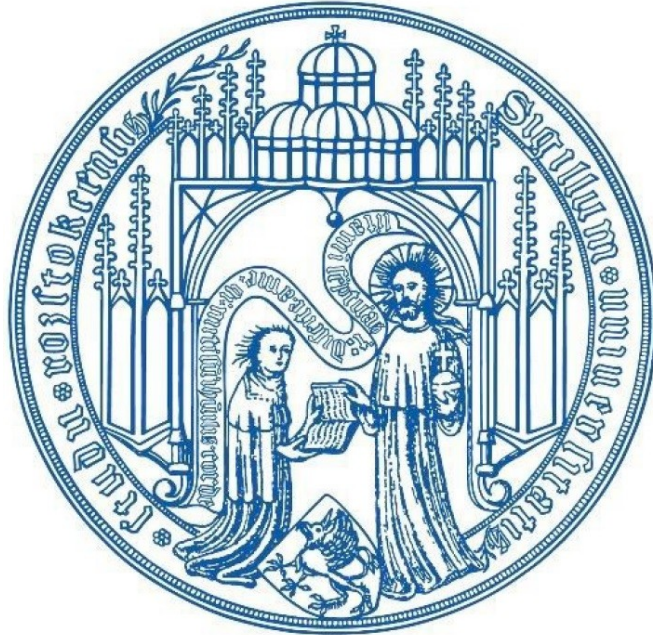


Molekulare Untersuchungen zur Optimierung der
Triebhaltung bei der Weinrebe (*Vitis vinifera* L.)



Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Universität Rostock

vorgelegt von
René Kaiser, geb. 10.10.1988 in Rostock

Datum der Einreichung: 6.9.2019
Datum der Verteidigung: 22.11.2019



Dieses Werk ist lizenziert unter einer
Creative Commons Namensnennung-Nicht kommerziell 4.0 International Lizenz.

Gutachter:

1. Gutachter:

Prof. Dr. Renate Horn

Abteilung Pflanzengenetik

Institut für Biowissenschaften, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Reinhard Töpfer

Julius Kühn-Institut (JKI)

Institut für Rebenzüchtung, Siebeldingen

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Zusammenfassung	1
Summary	3
2. Einleitung	5
2.1 Die Bedeutung der Ampelographie	5
2.2 Die Erziehung bei Weinreben - Ein unerlässlicher Arbeitsschritt.....	7
2.3 Pflanzenarchitektur als bedeutender Faktor in der Landwirtschaft	9
2.4 Gravitropismus als Faktor für die Steuerung der Pflanzenarchitektur	11
2.5 <i>TAC1</i> und <i>LAZY1</i> und ihr Einfluss auf den Pflanzenwuchs	12
2.6 Bedeutung von Virus-induced-gene-silencing	14
2.7 Zielsetzung	15
3. Material und Methoden	17
3.1 Enzyme, Vektoren, Software, Primer und Marker	17
3.2 Pflanzenmaterial	20
3.2.1 Anzucht und Haltungsbedingungen von Weinreben (<i>Vitis vinifera</i>)	20
3.2.2 Anzucht und Haltungsbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
3.3 Phänotypisierung des Pflanzenmaterials	22
3.4 DNA-Isolierung bei Weinreben und <i>Arabidopsis thaliana</i>	24
3.5 Molekularbiologische Methoden für Sequenzanalysen	24
3.5.1 Sequenzanalysen zu <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	24
3.5.2 Polymerasekettenreaktion	24
3.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung, Aufreinigung, A-Tailing und Ligation	25
3.5.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen	26
3.5.5 Transformation von <i>E. coli</i> über Hitzeschock und Elektroporation	26
3.5.6 Plasmid-Minipräparation und Sequenzanalysen	27
3.6 RNA-Isolierung bei Weinreben	28
3.7 Transkriptanalysen für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	28
3.7.1 Probennahme für die Transkriptanalysen	28
3.7.2 Herstellung cDNA, cDNA-Abgleich und Transkriptanalysen	29
3.8 Entwicklung von biologischen Markern für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	29
3.8.1 CAPS-Marker bei den Referenzsorten	29
3.8.2 CAPS-Marker in spaltenden S1-Populationen von 'Merzling' und 'Regent'	30
3.8.3 PCR-Marker in einem Weinrebensortiment	30

3.9 SSR-Analysen und Phänotypisierung in segregierenden S1-Populationen	31
3.10 Komplementationsanalysen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.10.1 Konstrukterstellung pGreenII 0179 und pGreenII 0229	32
3.10.2 Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> über Floral dip	33
3.10.3 Selektion und Charakterisierung der Transformanten	33
3.11 Proteinstruktur von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> und Promotorbereich	34
3.12 Agroinfiltration bei Weinreben	35
3.12.1 GLRaV2-Konstrukterstellung für <i>VviTAC1</i> , <i>VviLAZY1</i> und <i>VviPDS</i>	35
3.12.2 GVA-Konstrukterstellung für <i>VviTAC1</i> , <i>VviLAZY1</i> und <i>VviPDS</i>	36
3.12.3 Agroinfiltration bei Weinreben und Tabak (<i>Nicotiana tabacum</i>)	37
4. Ergebnisse	39
4.1 Phänotypisierung der Weinrebenreferenzsorten	39
4.1.1 Visuelle Bonitur der Triebhaltung	39
4.1.2 Charakterisierung von triebhaltungsrelevanten Merkmalen	41
4.1.3 Vergleich des Sprosswachstums über mehrere Boniturtermine	45
4.1.4 Zusammenhang Triebhaltung und Triebwinkel	45
4.1.5 Wahrnehmung Gravitation bei den Referenzsorten	47
4.2 Analyse genomischer Sequenzen bei der Weinrebe	47
4.2.1 Genomische Sequenzanalyse von <i>VviLAZY1</i>	47
4.2.2 Genomische Sequenzanalyse von <i>VviTAC1</i>	49
4.3 Vergleichende Transkriptanalysen zu <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	51
4.3.1 Transkriptanalysen von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> zum Boniturzeitpunkt I..	51
4.3.2 Transkriptanalysen von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> bei 12 Referenzsorten im Jahr 2017 zum Boniturzeitpunkt II	51
4.3.3 Transkriptanalysen von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> bei ausgewählten Referenzsorten zum Boniturzeitpunkt III	53
4.4 Untersuchungen zur cDNA von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	57
4.4.1 Sequenzvergleiche auf cDNA-Ebene von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	57
4.4.2 Verifizierung von Mutationen und Allelen über Restriktionsverdau	58
4.5 Untersuchungen für S1-Populationen von ‘Spätburgunder’ und ‘Trollinger’	60
4.5.1 Bonitur der Triebhaltung nach OIV 006	60
4.5.2 Genomische Sequenzanalysen der S1-Elternpflanzen	61
4.5.3 SSR-Analysen innerhalb der S1-Populationen	62
4.5.4 Korrelation von Triebhaltung und SSR-Analysen	63
4.6 Erprobung der Marker an zusätzlichem Pflanzenmaterial der Weinrebe	63

4.6.1 Austestung CAPS-Markern in S1-Populationen von ‘Merzling’ und ‘Regent’	63
4.6.2 Austestung von Markern innerhalb eines Weinrebensortiments	65
4.7 Komplementationsanalysen für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> bei <i>A. thaliana</i>	67
4.7.1 Komplementation mit <i>VviTAC1</i> -Überexpressionskonstrukten	67
4.7.2 Komplementation mit <i>VviLAZY1</i> -Überexpressionskonstrukten	69
4.8 Motive von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> sowie Promotorbereich	69
4.9 Proteinstruktur von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> nach I-TASSER	74
4.10 RNA-Silencing von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> bei Weinrebe und Tabak	75
4.10.1 RNA-Silencing mittels GVA-Konstrukte beim Tabak	75
4.10.2 RNA-Silencing mittels GLRaV2-Konstrukte bei der Weinrebe	75
5. Diskussion	77
5.1 Phänotypische Charakterisierung von Weinreben	77
5.2 Sequenzanalysen für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	80
5.3 Semiquantitative Transkriptanalysen für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	85
5.4 Korrelation von Triebhaltung und den Kandidatengen bei S1-Populationen	89
5.5 Komplementation von <i>Arabidopsis thaliana</i> durch <i>VviTAC1</i>	91
5.6 VIGS bei der Weinrebe	92
5.7 Biologische Rolle von <i>TAC1</i> und <i>LAZY1</i> und deren Bedeutung	94
5.8 Weitere Kandidatengene für die Beeinflussung des Verzweigungswinkels	97
5.9 Schlussfolgerungen	98
Literaturverzeichnis	XII
Anhang	XXI
Wissenschaftlicher Lebenslauf	XLIX
Selbständigkeitserklärung	L

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Weltweite Weinproduktion ab dem Jahr 2000	5
Abbildung 2: 100 bp-, 1 kb- und λ HindIII-Marker	19
Abbildung 3: Pflanzenmaterial von <i>Arabidopsis thaliana</i> für Komplementationsanalysen	22
Abbildung 4: Triebhaltung von Weinrebensorten nach OIV 006	22
Abbildung 5: Beispielhafte Vermessung des Triebwinkels in 5, 10 und 15 cm Wuchshöhe	23
Abbildung 6: Probennahme für Pflanzenmaterial von Nodien, Internodien und Blättern für Transkriptanalysen bei der Weinrebe zu drei Boniturzeitpunkten	29
Abbildung 7: 35S-CaMV-Kassette	32
Abbildung 8: Bonitur der Linie 'PN40024' der Sorte 'Pinot Noir'	39
Abbildung 9: Bonitur der Weinrebenreferenzsorten im Jahr 2018 bei einer Sprosslänge von 50-60 cm	40
Abbildung 10: Bonitur der Merkmale Triebhaltung, Triebwinkel nach 5, 10 sowie 15 cm Sprosslänge, Anzahl Internodien, Länge Internodien, Anzahl Verzweigungen, Sprossdurchmesser und Gesamtlänge Hauptspross in den Jahren 2017 und 2018	44
Abbildung 11: Spinnennetzdiagramm für die bonitierten Merkmale im Jahr 2017 und 2018 für die Wuchstypen aufrecht bis hängend	44
Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf des Längenwachstums des Hauptsprosses bei den Referenzsorten im Jahr 2017	45
Abbildung 13: Aus der Bonitur abgeleiteter Zusammenhang zwischen Triebwinkel und Triebhaltung	46
Abbildung 14: Wahrnehmung der Gravitation bei der Weinrebe	47
Abbildung 15: Auswirkungen der Mutationen auf die Aminosäureabfolge bei <i>VviLAZY1</i> in den Referenzsorten im Vergleich zu 'PN40024'	49
Abbildung 16: Auswirkungen von Mutationen auf die Aminosäureabfolge für die Referenzsorten bei <i>VviTAC1</i> im Vergleich zu 'PN40024'	51
Abbildung 17: Beispielhafter Abgleich von <i>VviGAPDH</i> für Internodium, Blatt und Nodium	52
Abbildung 18: Abgleich von <i>VviGAPDH</i> für Internodium, Blatt und Nodium zum Boniturzeitpunkt III	53
Abbildung 19: Transkriptanalysen für <i>VviTAC1</i> bei sechs ausgewählten Referenzsorten im Jahr 2018 für das Pflanzenorgan Nodium bei einer Sprosslänge von 50 cm	55
Abbildung 20: Transkriptanalysen für <i>VviLAZY1</i> bei sechs ausgewählten Referenzsorten im Jahr 2018 für das Pflanzenorgan Nodium bei einer Sprosslänge von 50 cm	56
Abbildung 21: Restriktionsverdau für die cDNA von <i>VviTAC1</i> zur Überprüfung festgestellter SNP's, die zu AS-Austauschen führen	60
Abbildung 22: Restriktionsverdau für die cDNA von <i>VviLAZY1</i> zur Überprüfung festgestellter SNP's, die zu AS-Austauschen führen	60
Abbildung 23: Erfassung des 'PN40024'- und D69E-Alles innerhalb einer S1-Population der Sorte 'Merzling' über einen Restriktionsverdau mit <i>ApoI</i>	64
Abbildung 24: Erfassung des 'PN40024'- und D69E-Alles innerhalb einer S1-Population der Sorte 'Regent' über einen Restriktionsverdau mit <i>ApoI</i>	64
Abbildung 25: Erfassung des 'PN40024'- und D69E-Alles innerhalb eines Weinrebensortiments mittels PCR	66

Abbildung 26: Nachweis <i>attac1</i> -Mutation, Col-0-Hintergrund und <i>VviTAC1</i> -Überexpressionskonstrukt.....	67
Abbildung 27: Phänotypisierung von Col-0 (Wildtyp), <i>attac1</i> -Mutante und <i>atlazy1</i> -Mutante über Vermessung von Verzweigungswinkel, Blattbreite und Blattlänge...	68
Abbildung 28: Auswirkung auf den Verzweigungswinkel in Komplementationsversuchen mit <i>attac1</i> -Mutanten über drei verschiedene <i>VviTAC1</i> -Überexpressionskonstrukte	69
Abbildung 29: Konservierte Regionen in der Proteinstruktur von <i>VviTAC1</i> bei verschiedenen Pflanzenarten	70
Abbildung 30: Konservierte Regionen in der Proteinstruktur von <i>VviLAZY1</i> bei verschiedenen Pflanzenarten	71
Abbildung 31: Vorhandensein der Komplexe I-V aus der Weinrebe bei LZ1-LZ6 aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	73
Abbildung 32: Proteinmodell für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> nach I-TASSER mit höchstem C-score.....	74
Abbildung 33: Inserttestnachweis für RNAi-Konstrukte von <i>VviTAC1</i>	75
Abbildung 34: Inserttestnachweis für RNAi-Konstrukte von <i>VviTAC1</i>	75
Abbildung 35: VIGS bei der Weinrebe mit den Auswirkungen auf Triebhaltung und Triebwinkel bei einer Sprosslänge von 50 cm	76
 Abbildung A 1: Stammbaum von ‘Aramon Noir’, ‘Augster Weiss’, ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Couderc 3309’ und ‘Muscat Ottonel’	XXVI
Abbildung A 2: Stammbaum von ‘Merzling’	XXVI
Abbildung A 3: Stammbaum von ‘Regent’	XXVII
Abbildung A 4: pGEM®-T Easy Vector System	XXVIII
Abbildung A 5: Vektorkarte pGreenII 0179.....	XXVIII
Abbildung A 6: Vektorkarte pGreenII 0229.....	XXIX
Abbildung A 7: Vektorkarte pSOUP	XXIX
Abbildung A 8: GLRaV-2-Konstrukt	XXX
Abbildung A 9: GVA-Konstrukt.....	XXX
Abbildung A 10: Aminosäureabfolge für <i>VviTAC1</i> (GSVIVG01027402001)	XXXI
Abbildung A 11: Aminosäureabfolge für <i>VviLAZY1</i> (GSVIVG01010528001)	XXXI
Abbildung A 12: Bonitur der 13 Referenzsorten im Jahr 2017 nach 13 Wochen Wachstum	XXXI
Abbildung A 13: Bonitur der 13 Referenzsorten im Jahr 2016 nach 13 Wochen Wachstum	XXXII
Abbildung A 14: Bonitur der 13 Referenzrebsorten im Jahr 2015 nach 15 Wochen Wachstum	XXXII
Abbildung A 15: Bonitur der Merkmale Triebhaltung, Triebwinkel nach 5, 10 sowie 15 cm Sprosslänge, Anzahl Internodien, Länge Internodien, Anzahl Verzweigungen, Sprossdurchmesser und Gesamtlänge Hauptspross in den Jahren 2017 und 2018 nach 15 Wochen	XXXIII
Abbildung A 16: Allgemeine Struktur von <i>VviTAC1</i> auf Grundlage des Referenzgenoms ‘PN40024’	XXXV
Abbildung A 17: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten ‘Augster’, ‘Cabernet Sauvignon’, ‘Garnacha Tinta’, ‘Merzling’ und ‘Monastrell’ für <i>VviTAC1</i> im Vergleich zum Referenzgenom ‘PN40024’	XXXV

Abbildung A 18: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Monastrell', 'Sauvignon Blanc', 'Muscat Ottonell', 'Vermentino' und 'Barbera Nera' für <i>VviTAC1</i> im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	XXXVI
Abbildung A 19: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Regent', 'Dattier de Beyrouth', 'Aramon Noir' und 'Couderc 3309' für <i>VviTAC1</i> im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024' ...	XXXVII
Abbildung A 20: Allgemeine Struktur von <i>VviLAZY1</i> auf Grundlage des Referenzgenoms 'PN40024'	XXXVIII
Abbildung A 21: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Augster', 'Cabernet Sauvignon', 'Garnacha Tinta', 'Merzling' und 'Monastrell' für <i>VviLAZY1</i> im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	XXXVIII
Abbildung A 22: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Monastrell', 'Sauvignon Blanc', 'Muscat Ottonell', 'Vermentino' und 'Barbera Nera' für <i>VviLAZY1</i> im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	XXXIX
Abbildung A 23: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Regent', 'Dattier de Beyrouth', 'Aramon Noir' und 'Couderc 3309' für <i>VviLAZY1</i> im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	XL
Abbildung A 24: Transkriptanalysen für <i>VviTAC1</i> bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Nodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II)	XLI
Abbildung A 25: Transkriptanalysen für <i>VviTAC1</i> bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Internodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II)	XLII
Abbildung A 26: Transkriptanalysen für <i>VviTAC1</i> bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Blatt nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II)	XLIII
Abbildung A 27: Transkriptanalysen für <i>VviLAZY1</i> bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Nodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II)	XLIV
Abbildung A 28: Transkriptanalysen für <i>VviLAZY1</i> bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Internodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II)	XLV
Abbildung A 29: Transkriptanalysen für <i>VviLAZY1</i> bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Blatt nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II)	XLVI
Abbildung A 30: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Trollinger WE S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' für <i>VviTAC1</i> im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	XLVII
Abbildung A 31: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Trollinger WE S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' für <i>VviLAZY1</i> im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	XLVIII

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Enzyme.....	17
Tabelle 2: Verwendete Vektoren	17
Tabelle 3: Verwendete bioinformatische Software	18
Tabelle 4: Primer und Primersequenzen	18
Tabelle 5: Referenzweinsorten mit zugewiesener Triebhaltung nach OIV 006.....	20
Tabelle 6: Weinrebsorten segregierender S1-Populationen	21
Tabelle 7: Weinrebsorten mit aufrechter und hängender Triebhaltung	21
Tabelle 8: Entwicklung von CAPS-Markern für detektierte SNP's, die einen Aminosäureaustausch nach sich zogen.....	30
Tabelle 9: Ausgewählte Haplotypen von <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> für Komplementationsanalysen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
Tabelle 10: Agroinfiltration ausgewählter Weinrebsorten mit GLRaV-2-Konstrukten .	37
Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Triebhaltung und Triebwinkel	46
Tabelle 12: Mutationen auf DNA- und AS-Ebene bei den 13 Referenzsorten für das Kandidatengen <i>VviLAZY1</i> basierend auf genomischen Sequenzanalysen	48
Tabelle 13: Mutationen auf DNA- und AS-Ebene bei den 13 Referenzsorten für das Kandidatengen <i>VviTAC1</i>	50
Tabelle 14: Unterschiede zwischen Sequenzen auf genomischer Ebene und cDNA- Ebene.....	57
Tabelle 15: Ableitung von CAPS-Markern für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i> basierend auf identifizierten AS-Austauschen.....	59
Tabelle 16: Bonitur der Triebhaltung über drei Jahre bei den S1-Populationen 'Trollinger S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' .	61
Tabelle 17: Spaltungsanalysen innerhalb der S1-Populationen 'Trollinger S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78'	61
Tabelle 18: Übersicht der Mutationen bei <i>VviTAC1</i> für die S1-Elternpflanzen von 'Spätburgunder' und 'Trollinger' im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	62
Tabelle 19: Übersicht der Mutationen bei <i>VviLAZY1</i> für die S1-Elternpflanzen von 'Spätburgunder' und 'Trollinger' im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'	62
Tabelle 20: Korrelation zwischen bonitierter Triebhaltung und SSR-Analysen bei S1- Populationen der Sorten 'Trollinger S1', 'Trollinger We 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' mittels des Pearson-Tests	63
Tabelle 21: Bonitur nach OIV 006 sowie Vorhandensein des 'PN40024'- und D69E-Allels bei der S1-Population 'Merzling'	65
Tabelle 22: Bonitur nach OIV 006 sowie Vorhandensein des 'PN40024'- und D69E-Allels bei der S1-Population 'Regent'	65
Tabelle 23: Beurteilung der Triebhaltung sowie Vorhandensein des 'PN40024'- und D69E-Allels innerhalb eines Weinrebsortiments	66
Tabelle 24: C-score, TM-score und RMSD-Wert nach einer Vorhersage der Proteinstruktur durch I-TASSER für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	74
Tabelle 25: Vergleich der Domänen I-V für TAC1 und LAZY1 bei verschiedenen Pflanzenarten	81
Tabelle 26: Einteilung konservativer und nicht-konservativer AS-Austausche.....	82
Tabelle 27: LAZY-Genfamilie bei <i>A. thaliana</i>	83

Tabelle A 1: TAC1 homologe Proteine bei verschiedenen Pflanzenarten	XXI
Tabelle A 2: LAZY1 homologe Proteine bei verschiedenen Pflanzenarten	XXI
Tabelle A 3: Genotypisierung über SSR-Analysen bei den Sorten ‘Trollinger S1’, ‘Trollinger WE 4-7’, ‘Spätburgunder Clevner’ und ‘Spätburgunder FR 52-78’	XXII
Tabelle A 4: Bonitur der Triebhaltung und SSR-Analysen in einer 0-1-Matrix für ‘Spätburgunder Clevner’ und ‘Spätburgunder FR 52-78’	XXIII
Tabelle A 5: Bonitur der Triebhaltung und SSR-Analysen in einer 0-1-Matrix für ‘Trollinger WE 4-7’ und ‘Trollinger S1’	XXIV
Tabelle A 6: Identifizierte Promotorelemente bei der Weinrebe für <i>VviTAC1</i> und <i>VviLAZY1</i>	XXV

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Å	Angström
ABCB	ATP-BINDING CASSETTE B
ANOVA	Analysis of Variance/Varianzanalyse
AS	Aminosäure
AUX1/LAX	AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Basenpaar
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumchlorid
CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences
cDNA	complementary DNA
Chr.	Chromosom
cm	Zentimeter
cM	Centimorgan
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLG	Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
D6PK	D6 protein kinase
E	Einstein
EAR	Ethylene-responsive element binding factor-associated amphiphilic repression
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et alii, et aliae, et alia
F	Farad
FDW	Forschungsring des Deutschen Weinbaues
g	Gramm und Gravitationskonstante
G	Guanin
<i>GAPDH</i>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GFP	green fluorescent protein
<i>GH3</i>	<i>Gretchen Hagen 3</i>
GLRaV-2	<i>Grapevine Leafroll-associated Virus-2</i>
GRSPaV	<i>Grapevine Rupestris Stem Pitting-associated Virus</i>
GUS	β-Glucuronidase
GVA	<i>Grapevine Virus A</i>
GWAS	Genome Wide Association Studies
h	Stunde
ha	Hektar
hl	Hektoliter
IAA	Indol-3-essigsäure

Abkürzungsverzeichnis

IDD	Indeterminate domain
IPGRI	Internationales Institut für Pflanzengenetische Ressourcen
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
JKI	Julius-Kühn-Institut
k	Kilo
kb	Kilobasenpaar
l	Liter
LB	Liquid broth
LPA	Loose plant architecture
m	Meter und milli
M	Molar
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miohl	Millionen Hektoliter
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
n	nano
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLS	Nuclear localization signal
nt	Nukleotid
ORF	Open reading frame
OIV	Organisation Internationale de la Vigne et du Vin / Internationale Organisation für Rebe und Wein
O.P.	Open pollination/Offene Abblüte
Pa	Pascal
PAT	Polarer Auxintransport
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase
PDS	Phytoene desaturase
PIN	PIN-Formed
PP2A	Protein-Phosphatase 2
PROG1	Prostrate growth 1
PVX	<i>Potato virus X</i>
PVP	Polyvinylpyrrolidon
p	piko
RMSD	root-mean-square deviation
RNA	ribonucleic acid/Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
s	Sekunde
SAIL	Syngenta Arabidopsis Insertion Library
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOB	Super optimal broth
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
SPL14	<i>SQUMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 14</i>
SSR	Simple Sequence Repeat
S1	Selbstungspopulation
T	Thymin
TAC1	Tiller angle control
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA

Abkürzungsverzeichnis

TM-score	template modeling score
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>
U	Unit
ÜE-Konstrukt	Überexpressionskonstrukt
U/min	Umdrehung pro Minute
UPOV	Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales (Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen)
V	Volt
VIGS	Virus induziertes Gen-Silencing
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
YEB	Yeast Extract Broth
μ	Mikro
Ω	Ohm

1. Zusammenfassung

Bei der Weinrebe (*Vitis vinifera*) geht eine aufrechte Triebhaltung und dadurch eine optimierte Pflanzenarchitektur mit einer großen Arbeitersparnis während der Rebenerziehung einher. Die markergestützte Selektion während der Züchtung kann hierbei die schnelle Optimierung der Pflanzenarchitektur unterstützen. Die Gene *TAC1* und *LAZY1* kommen im Pflanzenreich weit verbreitet vor und besitzen einen großen Einfluss auf die Architektur. Der Funktionsverlust von *TAC1* ruft einen aufrechten Wuchs mit schmalen Triebwinkeln und von *LAZY1* die Ausbildung eines asymmetrischen Wuchses durch den Verlust des Gravitropismus hervor. Ziel dieser Arbeit war es *VviTAC1* und *VviLAZY1* bei der Weinrebe für 13 Referenzsorten mit den Triebhaltungen aufrecht bis hängend phänotypisch und molekularbiologisch zu charakterisieren.

Die Phänotypisierung der Referenzsorten erbrachte einen signifikanten Zusammenhang zwischen schmalen Triebwinkeln und einer aufrechten Triebhaltung, die Bonitur weiterer Merkmale zeigte keine Signifikanzen. Um die Triebhaltung standardisiert zu erheben, wurde unter Gewächshausbedingungen der optimale Boniturzeitpunkt der Triebhaltung nach dem Boniturschlüssel OIV 006 auf eine Sprosslänge von 50-60 cm festgelegt. Wachstumsversuche zeigten weiterhin, dass alle Referenzsorten ihren Wuchs entlang eines Gravitationsvektors ausrichteten.

Sequenzanalysen auf genomischer sowie cDNA-Ebene zeigten für die Kandidatengene zahlreiche Unterschiede. Dies hatte nicht konservative Unterschiede auf Aminosäureebene zur Folge. Diesen wurde über Komplementationsanalysen mit *Arabidopsis thaliana* für *VviTAC1* und Wachstumsversuchen für *VviLAZY1* jedoch kein entscheidender Einfluss für die Proteinfunktion zugeschrieben. Mutationen mit einem Einfluss auf das Spleißverhalten oder alternatives Spleißen wurden nicht festgestellt.

Untersuchungen innerhalb von S1-Populationen für 'Spätburgunder FR 52-78', 'Spätburgunder Clevner', 'Trollinger S1' und 'Trollinger WE 4-7' sowie 'Merzling' und 'Regent' mittels SSR-Analysen und CAPS-Markern ließen ebenfalls keine Korrelation zwischen Triebhaltung und den beiden Kandidatengenen erkennen.

Semiquantitative Transkriptanalysen zeigten für frühe Wachstumsstadien eine fehlende Transkription von *VviTAC1* und *VviLAZY1*. Analysen für die Organe Blatt, Nodium und Internodium zu späteren Wachstumsstadien wiesen zudem auf eine große Variabilität zwischen den Sorten und einer gewebespezifischen Expression

hin. Dies ließ jedoch nicht auf eine ursächliche Beteiligung an der verschiedenen Ausbildung der Triebhaltung schließen.

VIGS-Konstrukte für ein RNA-Silencing von *VviTAC1*, *VviLAZY1* und *VviPDS* bei der Weinrebe wurden basierend auf GVA- und GLRaV-2-Vektoren erfolgreich erstellt. Eine zukünftige erfolgreiche Agroinfiltration soll den Einfluss der Kandidatengene auf die Triebhaltung zeigen.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass *TAC1* und *LAZY1* erstmalig molekularbiologisch umfangreich bei der Weinrebe charakterisiert werden konnten. Für diese ergab sich bei den untersuchten Sorten jedoch kein ursächlicher Zusammenhang mit der unterschiedlichen Ausbildung der Triebhaltung. Die Ableitung molekularer Marker für die frühzeitige Selektion im züchterischen Vorgang auf das Merkmal Triebhaltung war somit nicht möglich und wird ein Ziel für fortführende Arbeiten ausgehend von anderen Kandidatengenen sein.

Summary

An erect growth type for grapevine (*Vitis vinifera*) is a very important trait for an optimized plant architecture and saves time as well as labor during cultivation. In this context, the development of selective markers makes it possible to speed up breeding. The genes *TAC1* and *LAZY1* are common plant genes and have a major influence on plant architecture. While a knockout of *TAC1* leads to an erect growth type, a knockout of *LAZY1* leads to an asymmetric growth and the loss of gravitropism. Therefore, it was the goal to make a molecular biological characterization of *VviTAC1* and *VviLAZY1* in grapevine for 13 varieties with different growth types from erect to drooping.

Phenotyping of the 13 varieties indicated a significant connection between narrow branch angles and an erect growth type. Other traits did not show any significance. For standardization under greenhouse conditions, the point for best phenotyping was determined to be a shoot length of 50-60 cm. Plant growth experiments showed the ability of all grapevine varieties to detect gravitation.

Sequence analyses of genomic DNA and cDNA revealed numerous mutations within the two candidate genes, which were responsible for conservative and non-conservative amino acid substitutions. Complementation analyses with *Arabidopsis thaliana* for *VviTAC1* and plant growth experiments for *VviLAZY1* showed that these mutations do not have any impact on the growth type. Furthermore, no mutations at splice sites were detected and no alternative splicing was identified.

Investigations within the S1-populations of 'Spätburgunder FR 52-78', 'Spätburgunder Clevner', 'Trollinger S1' and 'Trollinger WE 4-7' as well 'Merzling' und 'Regent' with SSR analyses and CAPS marker also showed no correlation between the growth type and the candidate genes *VviTAC1* and *VviLAZY1*.

Semiquantitative transcript analysis revealed a missing or very low transcription rate for early growth stages for the two candidate genes. Analyses for leaf, node and internode of later growth stages showed a big variability between the varieties and a tissue specific transcription. It was not possible to conclude that the detected transcription was responsible for the different growth types of the varieties.

VIGS constructs for RNA silencing of *VviTAC1*, *VviLAZY1* and *VviPDS* in grapevine were generated on GVA and GLRaV-2 based vectors. In the future agroinfiltration of these constructs in grapevine will show the impact of the candidate genes on the growth type.

Finally, it should be highlighted that *VviTAC1* and *VviLAZY1* were, for the first time, characterized on the molecular level in grapevine. For the investigated varieties, no significant connection between the two candidate genes and the different growth types of the varieties could be found. The development of molecular markers for the trait of an erect growth type to speed up breeding was not possible yet and will be an important goal in the future, starting from different other candidate genes.

2. Einleitung

2.1 Die Bedeutung der Ampelographie

Seit mehreren tausend Jahren nimmt die Weinrebe eine kulturell und wirtschaftlich große Bedeutung ein. Die älteste Datierung einer Weinerzeugung reicht bereits 7000 Jahre aus dem Gebiet des Zāgros-Gebirge des heutigen Irans zurück (This et al. 2006). Wurde der Wein in der Mythologie einst als seltenes und kostbares Getränk der Götter bezeichnet, so beträgt die weltweite jährliche Weinproduktion mittlerweile 250-300 miohl (Abbildung 1), womit die Weinrebe zu den sehr bedeutsamen Kulturpflanzen gezählt werden darf.

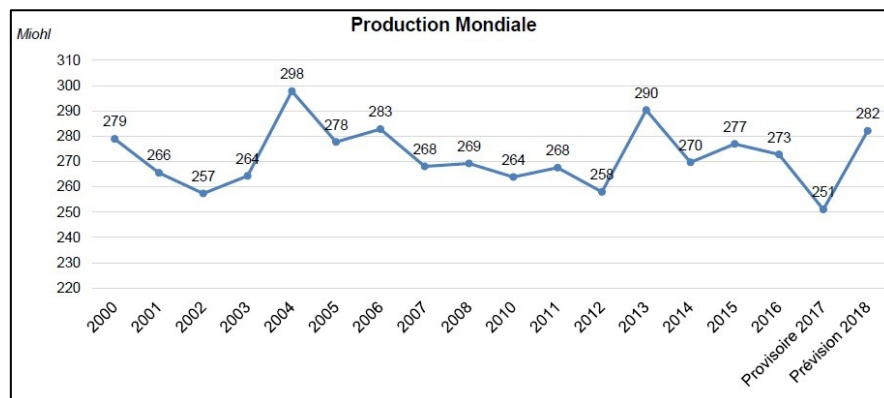


Abbildung 1: Weltweite Weinproduktion ab dem Jahr 2000 (<http://www.oiv.int/public/medias/6308/oiv-pressemitteilung-konjunkturdaten-zum-weltweiten-weinbau.pdf>)

Die weltweit intensiv betriebene Weinproduktion ist hierbei vornehmlich ein Erzeugnis der europäischen Rebe *Vitis vinifera* L. ssp. *vinifera*. Zugehörig zu den *Vitaceae* (Weinrebengewächse) entwickelte sich diese vor ungefähr 65 Millionen Jahren innerhalb dieser Familie (This et al. 2006). Der über die Jahrhunderte stark betriebene züchterische Vorgang, welcher ebenso noch heute ein wichtiger Bestandteil der Erzeugung neuer Weine ist, brachte bei der Weinrebe eine große Vielfalt an Kultivaren mit sich. So existieren von diesen weltweit einige tausend, wobei jedoch für die globale Weinindustrie nur einige wenige Dutzend von wirtschaftlichem Belang sind (This et al. 2006). So dominieren im deutschen Weinanbau z.B. besonders die Sorten ‘Müller-Thurgau’, ‘Riesling’, ‘Kerner’, ‘Silvaner’, ‘Weißer Burgunder’, ‘Scheurebe’, ‘Bacchus’, ‘Spätburgunder’, ‘Dornfelder’, ‘Trollinger’ und ‘Müllerrebe’ (Kadisch und Müller 2008).

Neben den positiven Aspekten einer hohen Sortenvielfalt können sich aus dieser auch Schwierigkeiten ergeben, wenn es um die zweifelsfreie und schnelle Zuordnung eines Kultivars geht. Die Ampelographie bezeichnet in diesem Zusammenhang die Lehre von der Beschreibung und Bestimmung von Rebsorten mitsamt ihrer wissenschaftlichen Klassifizierung und hat zum Ziel Kultivare ohne Irrtum einzuordnen. Erleichtert wird eine solche Zuordnung durch die hohe Heterogenität bei der Weinrebe. Unterschiede zwischen zwei Sorten können aber auch in Merkmalen liegen, die nur für das geschulte Auge sofort ersichtlich oder auch stark zeitpunktabhängig sind. Um einer Verwechslungsgefahr vorzubeugen, haben das OIV (Office International de la Vigne et du Vin / Internationales Amt für Rebe und Wein), die UPOV (Union Internationale pour la Protection des Obtentions Végétales / Internationaler Verband zum Schutz von Pflanzenzüchtungen) und Bioversity (vorher IPGRI, Internationales Institut für Pflanzengenetische Ressourcen) die Definition von Beschreibungsmerkmalen aufeinander abgestimmt. Der sich hieraus ergebende Katalog umfasst weit über 100 Deskriptoren (<http://www.oiv.int/public/medias/2274/code-2e-edition-finale.pdf>).

Für eine schnelle Rebsortenbeschreibung wird eine Primärdeskriptor-Prioritätsliste mit 14 Deskriptoren angeboten, welche ein hohes Unterscheidungs- und Identifizierungspotential besitzen. Damit wird eine schnelle Rebsortenbeschreibung über verschiedene Charakteristika bei Trieb (z.B. Öffnung der Triebspitze, Dichte der Wollbehaarung an der Triebspitze), Blatt (z.B. Form der Spreite, Form der Zähne) und Beere (z.B. Form, Hautfarbe) ermöglicht. Hierbei werden den Merkmalen objektive Ausprägungsstufen zugeordnet, was über die Angabe von Referenzsorten verdeutlicht wird (<http://www.oiv.int/public/medias/2274/code-2e-edition-finale.pdf>).

Die Erfassung von Merkmalen wird zumeist manuell durchgeführt. Neben dem erhöhten Zeit- und Personalaufwand und der hiermit verbundenen Beschränkung auf einzelne Merkmale kann auch die subjektive Einordnung der Merkmale ein Problem darstellen. Die automatisierte Phänotypisierung stellt hierfür einen Lösungsansatz dar. Diese bietet den Vorteil Merkmale präzise und objektiv zu erheben, den Probendurchsatz zu steigern, Fehler während der Phänotypisierung zu reduzieren sowie Daten noch nachträglich bewerten zu können (<https://www.julius-kuehn.de/zr/ab/phaenotypisierung/>). Speziell bei der Weinrebe ist eine Erfassung von Merkmalen, welche beispielsweise die Pflanzenarchitektur, den Ertrag, Krankheitsbefall oder auch die Traubenqualität betreffen, direkt im Feld unter

kontrollierten Bedingungen erforderlich. Dies macht eine nicht-invasive Methodik notwendig. Sich verändernde Lichtverhältnisse sowie der Laubwandhintergrund stellen für die automatisierte Phänotypisierung eine Herausforderung dar, welcher begegnet werden muss (Kicherer et al. 2017). Dank der Entwicklung neuer Elektronik, Software und Sensor-Techniken werden derzeit in diesem Bereich Fortschritte gemacht. Das Erfassen von Traubenertrag (Rose et al. 2016) und Befall mit Falschem Mehltau (Divilov et al. 2017) sind hierbei nur zwei Beispiele. Die Dauer für die Standardisierung der Techniken sowie der Kostenfaktor stellen jedoch noch eine Einschränkung dar, weshalb manuelle Phänotypisierungen weiterhin wichtiger Bestandteil der Rebenkultivierung und -zucht sein werden.

Neben den bereits erwähnten 14 priorisierten Merkmalen wurden weitere Deskriptoren eingeführt, welche eine tiefergehende Phänotypisierung des Sortenmaterials gewährleisten, aber auch die weinbaulichen (z.B. Schädlingsresistenz) und technologischen (z.B. Produktqualität) Eigenschaften beschreiben. Zu diesen Eigenschaften zählt unter anderem auch die Triebhaltung vor dem Heften und wird unter der OIV-Nummer OIV 006 geführt (<http://www.oiv.int/public/medias/2274/code-2e-edition-finale.pdf>). Dieses Merkmal nimmt eine wichtige Rolle bei der Kultivierung der Weinrebe sowie der Rebenerziehung ein und soll im Fokus dieser Arbeit stehen.

2.2 Die Erziehung bei Weinreben - Ein unerlässlicher Arbeitsschritt

Die Rebenerziehung ist als eine der wichtigsten Maßnahmen beim Anbau von Wein anzusehen. Nicht nur der Ertrag, sondern auch die Qualität der Trauben werden über diese maßgeblich bestimmt. Eine fehlerhafte Rebenerziehung und die damit verbundenen Einbußen lassen sich erst im Folgejahr korrigieren. Planung und richtige Durchführung sind somit in diesem Zusammenhang unerlässlich (Bauer 2015). Die Rebenerziehung ermöglicht unter anderem eine optimale Nutzung der Lichtenergie über die Ausrichtung der Laubwandstruktur und eine Erleichterung der Bodenpflege- und Pflanzenschutzmaßnahmen. Besonders hervorzuheben ist, dass über diese auch die Stärke des Wachstums und die Anzahl der zukünftigen traubentragenden Sommertriebe bestimmt wird (Adams et al. 1997). Die für eine Rebenerziehung erforderlichen Maßnahmen, die zumeist ein Unterstützungsgerüst und einen Rebschnitt im Winter umfassen, ergeben ein charakteristisches Stockgerüst des Holzes, welches auch als Erziehungssystem bezeichnet wird. Ziel ist

es, dem bei der Weinrebe stark ausgeprägten akrotonischen Wachstum sowie der Apikaldominanz entgegenzuwirken (Bauer 2015).

Akrotonisches Wachstum bedeutet, dass die Rebe danach strebt, in die Höhe zu wachsen, in dessen Folge die Basis verkahlt. Stellt dies für die in der Natur als Liane wachsende Weinrebe einen Vorteil dar, so ist dies für den Weinanbau eine stark negative Eigenschaft. Ein Niederbinden der Rebe bricht die Apikaldominanz und ermöglicht ein gleichmäßiges Austreiben von Seitentrieben entlang der Rute der Weinrebe (Schumann 2002). Hierbei ist zu beachten, dass zweijährige oder ältere Triebe keine Knospen mehr tragen, aus welchen Seitentriebe für die Traubenbildung austreiben könnten. Aus diesem Grund wird über einen jährlichen Rebschnitt einjähriges Holz, welches über im Frühjahr austreibende Winteraugen besitzt, zurückgeschnitten und die Weinrebe in ein gewünschtes Erziehungssystem eingebettet (Becker et al. 2012). Mehrjähriges Holz ist somit nur noch im Stammbereich zu finden, welcher die frisch austreibenden Triebe trägt.

Neben dem Brechen der Apikaldominanz wird durch den Rebschnitt und die Erziehung auch über die Anzahl an Winteraugen, welche für den Austrieb von traubentragenden Seitentrieben und somit der Ertragsleistung der Stöcke von Bedeutung sind, entschieden. Zu wenige Triebe wirken sich entsprechend negativ auf den Traubenertrag aus, wohingegen zu viele Triebe zu einem geringeren Zuckergehalt in den Trauben und somit einer geringen Qualität führen (Bauer 2015).

Die Rebenerziehung und der damit verbundene Rebschnitt werden von einer hohen Vielfalt an Systemen, aus denen gewählt werden kann, geprägt. Beeinflusst wird die Wahl des Erziehungssystems von der Rebsorte, der gewünschten Qualität und Quantität, den Möglichkeiten des arbeitstechnischen Aufwandes sowie dem Anbaugebiet. In Deutschland und auch weltweit dominieren vertikale Erziehungssysteme, bei welchen eine vertikale Laubwand über die Zuhilfenahme von Drähten erzeugt wird (Bauer 2015). Es existieren mit der Umkehrerziehung als frei hängendes System, der horizontalen Erziehung oder der Minimalschnitterziehung weitere Systeme, die sich stark von den vertikalen Systemen unterscheiden (Bauer 2015). Auf diese soll jedoch nicht weiter eingegangen werden.

Für die vertikale Drahtrahmenerziehung werden die Fruchtruten unter Durchführung des Rebschnittes horizontal - häufig im Flachbogen, Halbbogen oder Pendelbogen - in einem Drahtrahmen befestigt. Durch das Brechen der Apikaldominanz treiben die Knospen gleichmäßig aus und wachsen vertikal bzw. spalierförmig in Richtung der

darüber befindlichen Drähte, um im nächsten Schritt an diesen befestigt zu werden (Bauer 2015). Für diesen Arbeitsschritt ist es von großem Vorteil, wenn die Triebe aufgrund eines aufrechten Wuchses direkt in den Drahtrahmen wachsen. Je hängender die Triebhaltung der Weinrebe ist, desto höher wird der Arbeits- und Zeitaufwand diese in den Drahtrahmen einzufügen. Als ein Faktor der Pflanzenarchitektur stellt somit ein aufrechter Wuchs bei der Weinrebe einen großen arbeitstechnischen Vorteil dar und ist ein wünschenswertes Selektionsziel.

2.3 Pflanzenarchitektur als bedeutender Faktor in der Landwirtschaft

Die Pflanzenarchitektur hat in der Landwirtschaft allgemein einen zunehmenden Einfluss. Besonders bei Bäumen, welche im Vergleich zu anderen Kulturpflanzen ein langsames Wachstum aufweisen und über ihre Mehrjährigkeit eine Anbaufläche lange an sich binden, kann eine optimierte Pflanzenarchitektur mit einem gesteigerten Gewinn einhergehen (Hill und Hollender 2019). Dies kann sich unter anderem auf den Ertrag von Früchten oder auch auf den Holz- oder Biomasseertrag beziehen (Dardick et al. 2013). Des Weiteren beeinflussen z.B. die Baum- bzw. Kronenhöhe, Internodienlänge und besonders die Orientierung der Verzweigungen das Pflanzenmanagement als Kostenfaktor maßgeblich (Hill und Hollender 2019). Speziell die Kronenarchitektur bestimmt in diesem Zusammenhang die Produktivität über die Bepflanzungsdichte und Effizienz der Lichtabsorption als Maß der Photosyntheseleistung (Broeckx et al. 2012; Busov 2018).

Der potentielle Einfluss einer optimierten Architektur auf den Bepflanzungsdichte zeigt sich am Beispiel von Mais, der im Jahr 1930 noch mit 30.000 Pflanzen/ha angepflanzt wurde und heutzutage mit 80.000 Pflanzen/ha (Hollender und Dardick 2015). Als weiteres Beispiel kann die Zuchtform 'McIntosh Wijcik' beim Apfel genannt werden, welche über einen stark kompakten Wuchs verfügt und in einzelnen Jahren eine Ertragssteigerung von bis zu 300 % nach sich ziehen kann (Jacob 2010). Gründe hierfür sind ein kleiner Wuchs sowie verdickte und sehr kurze Internodien. Als genetische Ursache wird die Insertion eines Retrotransposons von 8202 bp vermutet, welches zur erhöhten Expression einer 16 kb downstream befindlichen 2-Oxoglutarat-abhängigen Dioxygenase führt und den beschriebenen Phänotyp nach sich zieht (Bai et al. 2012; Okada et al. 2016).

Es existieren zahlreiche weitere Beispiele im Pflanzenreich, bei denen einzelne Mutationen die Pflanzenarchitektur bestimmen. Diese können sich auf den Spross,

aber auch ebenso auf den Wurzelbereich beziehen. Beispiele hierfür sind Mutanten für das Gen *Slr* (Solitary root) bei *Arabidopsis thaliana*, welche keine lateralen Wurzeln ausbilden (Fukaki et al. 2002), oder agravitropische Mutanten mit asymmetrischen Wurzelwachstum (Perrin et al. 2005). In beiden Fällen ist der Zugang zu Nährstoffen und die allgemeine Ausbreitung der Wurzeln im Boden beeinflusst.

Die Pflanzenarchitektur ist jedoch nicht immer das Resultat von Mutationen. Sie kann ebenso in der natürlichen Plastizität einer Pflanze und der Antwort auf Umweltfaktoren wie Gravitation, Salz, Nitrat, Wasser oder Licht begründet liegen (Tian et al. 2014). Das Pflanzenwachstum und die Pflanzenarchitektur stellen somit auch stets eine Anpassung an externe Stimuli dar. Diese wahrgenommenen Reize werden pflanzenintern in ein Hormonsignal übersetzt und steuern das Wachstum. Zu diesen Hormonen zählen beispielsweise Gibberelline, Brassinosteroide, Strigolactone, Cytokinine und Auxine (Hill und Hollender 2019).

So kontrollieren z.B. Gibberelline das Längenwachstums des Sprosses bzw. des Stammes, spielen eine wichtige Rolle bei der Bestimmung von Kronencharakteristika und sind bedeutend für die Resistenz gegenüber Krankheitserregern (Bari und Jones 2009; Busov 2018). Brassinosteroide beeinflussen entwicklungsspezifische Prozesse wie das Stamm- und Wurzelwachstum, Entwicklung von Blüten und Früchten sowie abiotischen als auch biotischen Stressantworten bei Pathogenbefall (Bajguz und Hayat 2009). Die Bedeutung von Strigolactonen als Pflanzenhormon ist erst seit ungefähr zehn Jahren bekannt (Gomez-Roldan et al. 2008). Sie sind bedeutend für Sprossverzweigung, Wurzelwachstum, Wurzelhaarverlängerung und für das Austreiben von Knospen (Bennett und Leyser 2014). Cytokinine haben je nach Gewebe vielseitige Aufgaben. Hierzu zählen vaskuläre Differenzierung, Samenentwicklung, Wachstum und Verzweigung der Wurzel, Spross- und Blütenwachstum, Blattseneszenz oder auch der Austrieb von Knospen (Teichmann und Muhr 2015). Für letzteren Punkt ist die antagonistische Wirkung zu Auxinen hervorzuheben (Müller und Sheen 2007; Teichmann und Muhr 2015). Auxine besitzen somit große Bedeutung für das Wurzel- und Sprosswachstum sowie für die Entwicklung des vaskulären Gewebes. Zu betonen ist die Rolle bei tropischen Antworten wie dem Photo- und Gravitropismus (Woodward und Bartel 2005).

2.4 Gravitropismus als Faktor für die Steuerung der Pflanzenarchitektur

Gravitropismus steuert über die Prozesse der Gravitationswahrnehmung, der Signaltransduktion und der Anpassung des Zellenwachstums und der hiermit verbundenen Organkrümmung die Ausrichtung der jeweiligen Organe entlang eines Gravitationsvektors (Armengot et al. 2016). Ein entscheidendes Signal ist hierbei die Erzeugung von Auxingradienten im Wurzel- und Sprossbereich (Armengot et al. 2016; Kolesnikov et al. 2016). In Hinblick auf die Richtung des Wachstums wird die Wachstumsbewegung im Wurzelbereich als positiver Gravitropismus und im Sprossbereich als negativer Gravitropismus bezeichnet (He et al. 2017).

Für den Prozess der Gravitationswahrnehmung wird allgemein die Stärke-Statolithen-Theorie akzeptiert, bei welcher Amyloplasten (stärkegefüllte Leukoplasten) innerhalb von Statocyten (gravitationswahrnehmende Zellen) absinken und über die Interaktion mit Zellstrukturen eine Signalkaskade auslösen (Roychoudhry und Kepinski 2015). Innerhalb des Wurzelbereiches erfolgt die Gravitationswahrnehmung in der Region der Columella. Diese umfasst die Statocyten einer Wurzelregion und ist im Bereich der Wurzelkappe lokalisiert. Im Spross- und Blütenbereich erfolgt die Wahrnehmung in Zellen der Endodermis (Kolesnikov et al. 2016). Die Einleitung einer Antwort und somit die Anpassung des Wachstums auf ein sich änderndes Gravitationssignal kann hierbei innerhalb von Minuten erfolgen (Sato et al. 2015). Die Stärke-Statolithen-Theorie geht einher mit der Cholodny-Went-Hypothese, welche besagt, dass gravitropische Stimuli die bereits erwähnte laterale Auxinverteilung und in der Folge einen Auxingradienten erwirken (Kim et al. 2016). Die Bildung erfolgt hierbei in jungen Blättern und der Transport in basipetaler Richtung. Dieser Prozess wird auch unter der Auxin-Kanalisation-Hypothese zusammengefasst (Sauer et al. 2006).

Für den Auxintransport existieren zwei grundlegende Mechanismen: Das Hormon kann als polarer Auxintransport (PAT) direkt über das Phloem zusammen mit den Photosyntheseassimilaten transportiert werden oder von Zelle zu Zelle (Adamowski und Friml 2015). Für den Transport von Zelle zu Zelle ist zu beachten, dass im Apoplasten bzw. im Interzellularraum ein saurer pH-Wert existiert. Indol-3-Essigsäure (IAA) als wichtigster Vertreter der Auxine liegt somit in protonierter Form vor und kann die Zellmembran passiv passieren. Der neutrale pH-Wert im Cytosol hingegen führt zur Überführung von IAA in eine ionische Form, womit ein Transport nur noch aktiv über Transporter erfolgen kann (Adamowski und Friml 2015). Hierbei wird

zwischen drei wichtigen Transmembran-Protein-Familien unterschieden: Der Familie der AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) als influx carrier, sowie der ATP-BINDING CASSETTE B (ABCB) und PIN-Formed (PIN) efflux carrier (Xi et al. 2016). Die Erzeugung des Auxingradienten wird hierbei besonders über die Lokalisierung der PIN-Proteine in der Membran vermittelt, welche wiederum zahlreichen Regulationsmechanismen unterliegen. Als wichtiges Protein, welches in diesen Prozess involviert ist, kann unter anderem LAZY1 genannt werden. So konnte für das Protein AtLAZY1 gezeigt werden, dass es die asymmetrische Expression von PIN3 in der Columella reguliert und über diesen Weg die Gravitationsantwort und Pflanzenarchitektur mitbestimmt (Taniguchi et al. 2017). LAZY1 gehört wiederum zur Familie der IGT-Proteine, welche eine Vielzahl von Proteinen beherbergt. Dies schließt unter anderem TAC1 (tiller angle control gene) mit ein, welches ebenso bedeutsam für die Ausbildung der Pflanzenarchitektur ist (Dardick et al. 2013).

2.5 TAC1 und LAZY1 und ihr Einfluss auf den Pflanzenwuchs

Die Gene *TAC1* und *LAZY1* wurden anfänglich beim Reis (*Oryza sativa*) (Li et al. 2007; Yu et al. 2007) und Mais (*Zea mays*) (Dong et al. 2013; Ku et al. 2011) untersucht und nach ihrer Entdeckung zunächst als gräserpezifisch angesehen. Dass dies nicht der Fall ist, sondern eine Verbreitung im gesamten Pflanzenbereich der Angio- und Gymnospermen vorliegt, wurde erstmalig bei Dardick et al. (2013) über Untersuchungen beim Pfirsich und Yoshihara et al. (2013) bei *Arabidopsis thaliana* beschrieben. Komplementationsversuche mit der *Arabidopsis* Mutante *attac1* konnten zeigen, dass das Gen aus Pfirsich in der Lage ist, den Mutantenphänotyp aufzuheben (Dardick et al. 2013). Beide Gene wurden in der Folge beim Apfel (*Malus x domestica*) (Wang et al. 2018), der Pappel (*Populus*) (Xu et al. 2017), *Miscanthus sinensis* (Zhao et al. 2014), Raps (*Brassica napus*) (Sun et al. 2016; Wang et al. 2016) und Tomate (*Solanum lycopersicum*) (González-Arcos et al. 2019) beschrieben. Zahlreiche weitere homologe Gensequenzen von *TAC1* und *LAZY1* sind über öffentlich Internetplattformen wie der NCBI-Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zugänglich.

Bei allen oben genannten Beispielen bringt eine sich ändernde Expression der Gene *TAC1* und *LAZY1* eine Veränderung des Phänotyps mit sich. So führt ein Knockout von *TAC1* zur Ausbildung von schmalen Verzweigungswinkeln zwischen Haupt- und Seitentrieben (Dardick et al. 2013). Dies hat bei Pflanzen einen verstärkt aufrechten

Wuchs zur Folge. Als ursächliche Mutationen können beispielsweise beim Reis eine Mutation an einer 3'-Spleißstelle (Jiang et al. 2012; Yu et al. 2007) oder beim Pfirsich ('Italian Pillar') eine den Leserahmen verschiebende Insertion genannt werden (Dardick et al. 2013).

Für den Reis stellt der aufrechte und kompakte Wuchs einen großen Selektionsvorteil dar, da sich der Ertrag pro Fläche aufgrund einer dichteren Bepflanzung enorm erhöht und sich die Pflanzen im geringeren Maß selbst beschatten (He et al. 2017). Auf der anderen Seite führen schmalere Verzweigungswinkel zu einer geringeren Durchlüftung der Pflanze und somit einer erhöhten Krankheitsanfälligkeit, was den Vorteilen aber nicht überwiegt (He et al. 2017). Ähnlich gestaltet es sich beim Pfirsich, bei welchem durch eine Herunterregulierung von *TAC1* und den hiermit verbundenen schmaleren Verzweigungswinkeln sowie dem aufrechteren Wuchs die Möglichkeit einer dichteren Bepflanzung gestattet wird (Hollender et al. 2018). Als wichtiger Faktor für den landwirtschaftlichen Anbau ist hervorzuheben, dass beim Pfirsich trotz der Auswirkungen auf den Phänotypen keine Unterschiede in der Fruchtanzahl oder dem Ertrag auftreten (Hollender et al. 2018). Die Vorteile, welche die richtige genetische Konstitution von *TAC1* mit sich bringt, sind auf viele weitere Kulturpflanzen übertragbar. Die biologische Rolle von *TAC1* wurde bisher noch nicht aufgeklärt, jedoch wurde nachgewiesen, dass dessen Expression lichtabhängig ist (Waite und Dardick 2018). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass über die Modulierung der Verzweigungswinkel eine Antwort auf photosynthetische Signale über die Ausrichtung der Pflanze zum Licht erfolgt. Hinweise hierfür bietet die Promotorregion von *TAC1* mit einer Vielzahl von lichtabhängigen Elementen (Waite und Dardick 2018).

Ein Charakteristikum von *TAC1* und *LAZY1* ist der Besitz von vier hoch konservierten Domänen. Hierunter fällt auch das für die Familie namensgebende IGT-Motiv in der Domäne II. Domänen bekannter Proteinfunktion sind nicht vorhanden (Dardick et al. 2013). *LAZY1* besitzt im Gegensatz zu *TAC1* zudem am C-terminalen Ende eine zusätzliche fünfte konservierte Region mit einem EAR-Motiv (Dardick et al. 2013), welches für seine transkriptionelle Repression im Pflanzenreich bekannt ist (Kagale und Rozwadowski 2011). Die biologische Funktion von *LAZY1* ist dennoch dieser Kenntnisse weitgehend unbekannt. Die Existenz einer Transmembran-Domäne sowie einer NLS-Domäne (nuclear localization signal) (Howard et al. 2014)

unterstützen die Ergebnisse von Yoshihara et al. (2013), die eine Lokalisierung von *LAZY1* in der Peripherie der Zellmembran und im Nucleus zeigten. Letzteres scheint für die Proteinfunktion bei *Arabidopsis thaliana* jedoch ohne Relevanz zu sein (Sasaki und Yamamoto 2015). Ohne die direkte biologische Rolle von *LAZY1* aufgedeckt zu haben, ist dennoch bekannt, dass es einen entscheidenden Faktor innerhalb des Gravitropismus darstellt. Dies kann insoweit eingegrenzt werden, dass die Funktion nach der Amyloplasten-Sedimentation und vor der Auxinlokalisierung greifen muss (Hollender et al. 2018). Ein Funktionsverlust von *LAZY1* bedeutet eine Insensitivität gegenüber der Gravitation und zieht ein asymmetrisches und ungerichtetes Pflanzenwachstum nach sich, welches für die Pflanzenarchitektur einen großen negativen Aspekt darstellt (Yoshihara et al. 2013). *TAC1* und *LAZY1* üben somit gleichermaßen einen großen, wenn auch entgegengesetzten, Einfluss auf die Pflanzenarchitektur aus.

2.6 Bedeutung von Virus-induced-gene-silencing

Um die Funktion von Genen zu untersuchen, existieren zahlreiche Ansätze. Eine Möglichkeit hierfür stellt das Virus-induced-gene-silencing (VIGS) dar. Als natürliche Abwehrreaktion gegenüber Viren nutzt es den Mechanismus der RNA-Interferenz aus und ermöglicht den gezielten Knockdown spezifischer Gene (Baulcombe 1999). Nachdem in den 1980ern zunächst die transiente Genexpression in Pflanzen eingeführt wurde, folgte schnell die Etablierung erster Systeme für Tabak und *Arabidopsis thaliana*, um die Expression von Genen zu verändern. Hierbei wurde sich unter Anderem zunächst des Prinzips der Blatinfiltration über Agrobakterien bedient (Jelly et al. 2014).

Erste Methoden des Gentransfers für die Weinrebe wurden in den frühen 1990ern eingeführt (Jelly et al. 2014). Dies beinhaltete beispielsweise die Arbeit mit Protoplasten. Diese war und ist aufgrund der schlechten Regenerationsfähigkeit von Weinreben jedoch sehr erschwert. Das Partikelbombardment als weiteres häufig angewandtes Verfahren, um einen spezifischen Einfluss auf die Genexpression zu nehmen, stellt aufgrund des hohen methodischen Anspruches sowie dem Kostenfaktor ebenfalls keine optimale Methode für die Weinrebe dar (Jelly et al. 2014).

Eine Infiltration über die Stomata-Öffnungen der Weinrebe ist grundsätzlich möglich, scheint jedoch aufgrund der Blattstruktur erschwert und vom Wachstumsstadium der

Pflanze abhängig zu sein. Methoden wie die Vakuuminfiltration können dieses Problem jedoch lösen (Ben-Amar et al. 2013). Natürlich bei der Weinrebe vorkommende Viren wie GVA (*Grapevine Virus A*), GLRaV-2 (*Grapevine Leafroll-associated Virus-2*) und GRSPaV (*Grapevine Rupestris Stem Pitting-associated Virus*) und deren gentechnischen Veränderung, ermöglichten in den letzten Jahren die Entwicklung von Vektorkonstrukten (Jelly et al. 2014). Diese sollten das Virus-induced-gene-silencing auch bei der Weinrebe ermöglichen, um den spezifischen Knockdown von Genen zu realisieren.

2.7 Zielsetzung

Die Ausbildung einer aufrechten Triebhaltung stellt für die Rebenerziehung und dem hiermit verbundenen Arbeitsaufwand einen erheblichen Vorteil dar. Infolgedessen war es Ziel dieser Arbeit, das Merkmal Triebhaltung bei der Weinrebe genauer zu charakterisieren, um basierend auf einen Kandidatengenansatz die eventuelle Ableitung von Markern für eine frühzeitige und zielgerichtete Selektion für einen aufrechten Wuchs zu ermöglichen. Hierzu standen 13 Referenzweinrebsorten mit einer nach der OIV 006 festgestellten Triebhaltung zur Verfügung. Aufgrund des bei zahlreichen Pflanzenarten beschriebenen direkten Zusammenhangs von *TAC1* und *LAZY1* mit der Pflanzenarchitektur sollten die genomischen und cDNA-Sequenzen für diese Kandidatengene bei den Referenzsorten ermittelt und auf relevante Unterschiede untersucht werden. Weiterführend sollten diese Sequenz-Daten mit Transkriptanalysen für verschiedene Entwicklungsstadien und Gewebe der Weinrebe sowie mit einer Phänotypisierung unterschiedlicher Merkmale wie dem Triebwinkel und der Triebhaltung korreliert werden.

Über SSR-Analysen, Sequenzanalysen und einer Phänotypisierung innerhalb von S1-Populationen der Sorten 'Trollinger S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78', 'Merzling' und 'Regent' wurde eine auf die Triebhaltung bezogene Aufspaltung sowie eine Korrelation der Kandidatengene mit diesem Merkmal untersucht.

Komplementationsanalysen mit *Arabidopsis thaliana* Mutanten sollten es ermöglichen, die Funktion oder den Funktionsverlust verschiedener festgestellter Genvarianten von *VviTAC1* und *VviLAZY1* zu erschließen und in Zusammenhang mit identifizierten Mutationen zu bringen.

2. Einleitung

Abschließende Untersuchungen mit auf GLRaV-2 (*Grapevine leafroll-associated virus-2*) und GVA (*Grapevine virus A*) basierten VIGS-Vektorkonstrukten sollten über eine Agroinfiltration ein RNA-Silencing der Gene *PDS* (Phytoene desaturase), *TAC1* und *LAZY1* ermöglichen, um den Einfluss der beiden Kandidatengene auf die Pflanzenarchitektur der Weinrebe zu erfassen.

3. Material und Methoden

3.1 Enzyme, Vektoren, Software, Primer und Marker

Für die durchgeführten Versuche sind sämtliche verwendeten Enzyme (Tabelle 1), Vektoren (Tabelle 2), bioinformatische Software (Tabelle 3), Primer (Tabelle 4) sowie DNA-Marker für gelelektrophoretische Auftrennungen (Abbildung 2) in folgenden Tabellen und Abbildungen dargestellt.

Tabelle 1: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller/Referenz
<i>DNAseI</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Exo-Klenow-Fragment	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
FIREPol® DNA Polymerase	Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estland
Phusion-Polymerase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym <i>Apal</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym <i>ApoI</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym <i>BamHI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym <i>EcoRV</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym <i>FseI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym <i>HindIII</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym <i>Hinfl</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym <i>Hpy166II</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym <i>MseI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym <i>NotI</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym <i>PacI</i>	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Restriktionsenzym <i>RsaI</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Restriktionsenzym <i>SacI</i>	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
RevertAid-Reverse-Transcriptase	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Ribonuclease A	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<i>Taq</i> DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
T4 Ligase	Promega GmbH, Mannheim

Tabelle 2: Verwendete Vektoren

Vektor	Hersteller/Referenz
pGEM®-T Easy Vector Systems	Promega GmbH, Mannheim
pGreenII 0179	pGreen
pGreenII 0229	pGreen
vLR2-GFP	Valerian Dolja, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA
pCambia2301-GVA	Munir Mawassi, Agricultural Research Organization - Volcani Center, Bet Dagan, Israel

Tabelle 3: Verwendete bioinformatische Software

Bioinformatische Software	Hersteller/Referenz
BioEdit Version 7.2.3	Ibis Biosciences, Carlsbad, CA, USA
GeneMapper Version 4.0	Applied Biosystems, Darmstadt
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software, CA, USA
Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Vector NTI Advance 11.0	Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Tabelle 4: Primer und Primersequenzen

Primer	Primersequenz	Verwendung
V1	AGGGAGAGATTAAGCAAAGAGG	• PCR (3371 bp) von <i>VviTAC1</i> für die Klonierung (gDNA)
V11	ACAACCAAACCTCCATCAAACG	
V12	CCAACCAAATCACCAAATCTT	• PCR (4388 bp) von <i>VviLAZY1</i> für die Klonierung (gDNA)
V24	TGTTTCTCTCAAGCCCATTATG	
SP6	CGATTTAGGTGACACTATAG	• Sequenzanalysen • Inserttest
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
V2	CTGATACACAAGCTTTGCTGAAG	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V3	CCATTTTGGTTTGGACCATC	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V4	CTTCTTGCCCTAGCTTGGGTTGAG	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V5	TGGCACCAAATTAAGAAATGC	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V6	AAGCATGTCCACAAGTGCAA	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V7	TGCCTCCTAAAGTGTAGCCAAA	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V8	TCCCCACAGTGAATCAATTAA	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V9	TGAGAGACAAGACATTGTTTCAC	• Sequenzanalysen <i>VviTAC1</i>
V14	CCTCTTTTCCTTTTGTAGAGACA	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V15	TGGGCCAATTCAATGGAT	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V16	GCAAGAGAAGAAGAAGATGAC	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V17	TCATTCCCAAGGGACATGTTC	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V18	CAAGAATGGCATCTTCTATGACG	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i> • Transkriptanalysen <i>VviLAZY1</i> • Nachweis Überexpressions-konstrukt <i>VviLAZY1</i>
V19	TGCACCCTTTTGTAGACGT	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V20	GCCAAAATTAGAAGGAAATCATTG	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V21	GTTCTGAAATTGCTGCTGATG	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V22	AGTTGCTCATGTTGTAGTCACTGT	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V23	ATCCGATCTCCATTGTTGCA	• Sequenzanalysen <i>VviLAZY1</i>
V48	TCAAGGTCAAGGACTCTAACACC	• cDNA-Abgleich für <i>VviGAPDH</i>
V49	CCAACAACGAACATAGGAGCA	
V85	TCTCCTTTGCCAAGAAGCTCAT	• Transkriptanalysen für <i>VviTAC1</i>
V86	TAGCATCTTGGGTTTGAAGCAG	
V24	TGTTTCTCTCAAGCCCATTATG	• Transkriptanalysen für <i>VviLAZY1</i> • Nachweis Überexpressions-konstrukt <i>VviLAZY1</i>
V40	AAGGATCCATGAAGATCTTCAATTGG	• Entwicklung CAPS-Marker • PCR (876 bp) von <i>VviTAC1</i> für Sequenzierung (cDNA)
V41	AAGAGCTCTCAAACCATGGTAGCAT	
V42	AAGCTTATGAAGTTACTAGGTTGGA	• Entwicklung CAPS-Marker • PCR (1146 bp) von <i>VviLAZY1</i> für Sequenzierung (cDNA)
V43	GGATCCTTAGAGCTCCAACACCAGA	
V44	GATTATCAAGACCTCCCTGCA	• PCR-Marker für das D69E-Allel
V45	GACAATAGATCACATTGCCCAAG	• PCR-Marker für das 'PN40024'-Allel

Tabelle 4: Primer und Primersequenzen

Primer	Primersequenz	Verwendung
V85	TCTCCTTTGCCAAGAAGCTCAT	• Nachweis Überexpressions-konstrukt <i>VviTAC1</i>
V86	TAGCATCTTGGGTTTGAAGCAG	
V29	TCAATTGTTCTGTGTGCGTTT	• Nachweis Genotyp <i>attac1</i> -Mutante und Columbia-0
V31	TTAAAAACGTCCGCAATGTG	• Nachweis Genotyp <i>attac1</i> -Mutante
V30	AAAAGCTCCGCAAGTGTTGT	• Nachweis Genotyp Columbia-0 (<i>TAC1</i>)
V34	CAAGGTTTTTACAACACAGAGCAA	• Nachweis Genotyp <i>atlazy1</i> -Mutante und Columbia-0 (<i>LAZY1</i>)
V35	GCTGACACCCATCATAATGCTT	• Nachweis Genotyp Columbia-0 (<i>LAZY1</i>)
V36	ATATTGACCATCATACTCATTGC	• Nachweis Genotyp <i>atlazy1</i> -Mutante
V115	CGCTTAATTAACCACACTGGCTGACTTGTTT	• PCR <i>VviTAC1</i> für GLRaV-2-VIGS-Konstrukt (322 bp)
V116	ATAGGCCGCGCCCTCCATTTCCAACAGTGGCGA	
V117	CGCTTAATTAATGACCCATCTACGCCAACA	• PCR <i>VviLAZY1</i> für GLRaV-2-VIGS-Konstrukt (336 bp)
V118	ATAGGCCGCGCCCACTGTGGTTGTTTCTGGCA	
V119	CGCGGCCGCGCCTGTAATTGCTGGTGCAGGTTTG	• PCR <i>VviPDS</i> für GLRaV-2-VIGS-Konstrukt (364 bp)
V120	ATAGGCCGCGCCTTCCTCAGGATGGCCCATATC	
V121	TGTTGTGCGAGCTTCTGGAG	• Nachweis vLR2-Vektor über den Hsp70h-Genbereich (597 bp)
V122	TACAAAGGCATGCTTCCTGA	
V103	CACCCTCCATTTCCAACAGTGGCGA	• PCR <i>VviTAC1</i> für GVA-VIGS-Konstrukt (303 bp)
V104	CCCACTGGCTGACTTGTTT	
V105	CACCCACTGTGGTTGTTTCTGGCA	• PCR <i>VviLAZY1</i> für GVA-VIGS-Konstrukt (318 bp)
V106	ATGACCCATCTACGCCAACA	
V107	CACCTTCCTCAGGATGGCCCATATC	• PCR <i>VviPDS</i> für GVA-VIGS-Konstrukt (346 bp)
V108	TGTAATTGCTGGTGCAGGTTTG	
V123	TGCTAGATCTAGAGGTAGAAGT	• Nachweis GVA Vektor über den Bereich ORF1 (495 bp)
V124	TAACATCATACAGGTACTCGCT	

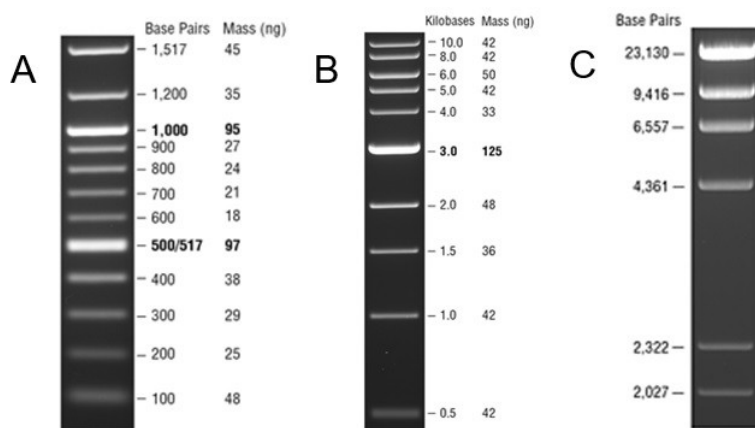


Abbildung 2: 100 bp-, 1 kb- und λ HindIII-Marker, A= 100 bp-Marker (<https://www.neb.com/products/n3231-100-bp-dna-ladder#Product%20Information>), B= 1 kb-Marker (<https://www.neb.com/products/n3232-1-kb-dna-ladder#Product%20Information>), C= λ HindIII-Marker (<https://international.neb.com/products/n3012-dna-hindiii-digest#Product%20Information>)

3.2 Pflanzenmaterial

3.2.1 Anzucht und Haltungsbedingungen von Weinreben (*Vitis vinifera*)

Für Probennahmen von Pflanzenmaterial sowie einer Phänotypisierung wurden in den Untersuchungsjahren 2014-2018 insgesamt 13 Referenzweinrebensorten, welche eine nach dem Boniturschlüssel OIV 006 zugeteilte Triebhaltung besaßen, mit jeweils zehn Pflanzen unter Gewächshausbedingungen kultiviert (Tabelle 5). Für sieben Sorten sind vorliegende Stammbäume in Abbildung A 1 bis Abbildung A 3 dargestellt. Des Weiteren wurde für eine Bonitur der Triebhaltung die Sorte 'PN40024' mitgeführt, welche aus Selbstungen der Sorte 'Pinot Noir' stammt, eine Homozygotie von bis zu 93 % besitzt, auf genomischer DNA-Ebene sequenziert für die Weinrebe vorliegt und für Sequenzvergleiche herangezogen wurde (Jaillon et al. 2007; Velasco et al. 2007). Das sequenzierte Genom einer Tafeltraube wurde für Vergleiche nicht betrachtet (Di Genova et al. 2014).

Tabelle 5: Referenzweinrebensorten mit zugewiesener Triebhaltung nach OIV 006

Weinrebensorte	Triebhaltung	OIV 006	Züchter
'Augster'	aufrecht	1-2	JKI Geilweilerhof
'Garnacha Tinta'	aufrecht	1	JKI Geilweilerhof
'Monastrell'	aufrecht	1	JKI Geilweilerhof
'Cabernet Sauvignon'	aufrecht	1-2	JKI Geilweilerhof
'Merzling'	aufrecht	1	JKI Geilweilerhof
'Muscat Ottonel'	halb aufrecht	3	JKI Geilweilerhof
'Sauvignon Blanc'	halb aufrecht	3	JKI Geilweilerhof
'Vermantino'	waagerecht/standard	5	JKI Geilweilerhof
'Barbera Nera'	waagerecht/standard	5	JKI Geilweilerhof
'Regent'	waagerecht/standard	5	JKI Geilweilerhof
'Aramon Noir'	halb hängend	7	JKI Geilweilerhof
'Dattier de Beyrouth'	halb hängend	7	JKI Geilweilerhof
'Couderc 3309'	hängend	9	JKI Geilweilerhof

Für die Anzucht der Weinreben wurden Holzstecklinge nach einer Winterruhe auf zwei Augen zugeschnitten, acht Stunden gewässert, sechs Stunden in einer 0,5%igen Chinosolsulfat-Kaliumsulfatlösung (Dermapharm AG, Grünwald) sterilisiert, in Jiffy 7 Quelltöpfe gesteckt und bei einer Temperatur von 25-28 °C sowie einer hohen Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach Austreiben der Wurzeln wurden die Pflanzen auf Erde in Töpfe überführt und unter Gewächshausbedingungen (Temperatur: 18-20 °C, Luftfeuchtigkeit: 60 %, Lichtintensität: 90-400 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$, Tag-Nacht-Rhythmus: 16 h : 8 h) gehalten.

Für fortführende Untersuchungen wurden spaltende S1-Populationen der Sorten 'Spätburgunder FR 52-78', 'Spätburgunder Clevner', 'Trollinger S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Merzling' und 'Regent' (Tabelle 6) unter Gewächshausbedingungen gehalten sowie Blattmaterial von 15 aufrecht und sieben hängend wachsenden Weinrebensorten (Tabelle 7) untersucht. Sämtliche Pflanze wurden vom JKI am Geilweilerhof (Siebeldingen) zur Verfügung gestellt. Blattmaterial der S1-Elternpflanzen der Sorten 'Spätburgunder FR 52-78', 'Spätburgunder Clevner', 'Trollinger S1' und 'Trollinger WE 4-7' wurde von Herrn Dr. Sturm (Staatliche Lehr- und Versuchsanstalt für Wein- und Obstbau Weinsberg) bereitgestellt.

Tabelle 6: Weinrebensorten segregierender S1-Populationen

Mutter	Wuchstyp Mutter	Vater	Stückzahl
'Spätburgunder FR 52-78'	standard/waagerecht	O.P.	41
'Spätburgunder Clevner'	aufrecht	O.P.	43
'Trollinger S1'	aufrecht	O.P.	26
'Trollinger WE 4-7'	standard/waagerecht	O.P.	24
'Merzling'	aufrecht	O.P.	21
'Regent'	standard/waagerecht	O.P.	47

Tabelle 7: Weinrebensorten mit aufrechter und hängender Triebhaltung

Weinrebensorte	Triebhaltung	Weinrebensorte	Triebhaltung
'Apro Feher'	aufrecht	'Blussard Spaet blau'	aufrecht
'Hosszunyelue'	aufrecht	'Panse Precoce'	aufrecht
'Csmorika'	aufrecht	'Calardis Blanc'	aufrecht
'Beerheller'	aufrecht	'Osztrak Feher'	aufrecht
'Plantscher'	aufrecht	'Hoffman 28/95'	hängend
'Olber'	aufrecht	'Möhrenkönig'	hängend
'Putzscher'	aufrecht	'Fraueller'	hängend
'Javor Weiss'	aufrecht	'Felicia'	hängend
'Schwarzelbling'	aufrecht	'Schiele 14/95'	hängend
'Geisenhahn 30/96'	aufrecht	'Chasselas Rouge'	hängend
'Hartig 373'	aufrecht	'Dunkelfelder'	hängend

3.2.2 Anzucht und Haltungsbedingungen von *Arabidopsis thaliana*

Für Komplementationsanalysen von *A. thaliana* standen die *attac1*-Einzelmutante (SAIL_605_E02) als SAIL-Linie (Sessions 2002), die *atlazy1*-Einzelmutante (GABI_591A12) als GABI-Kat-Linie (Rosso et al. 2003), die *attac1/atlazy1*-Doppelmutante und mit Columbia-0 der wildtypische Hintergrund dieser Linien zur Verfügung (Abbildung 3). Die SAIL-Linie besitzt eine Bialaphos- und die GABI-Kat-

Linie eine Sulfadiazin-Resistenz. Die Pflanzen wurden unter einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 h/12 h bei 22 °C/20 °C in einer Klimakammer gehalten.

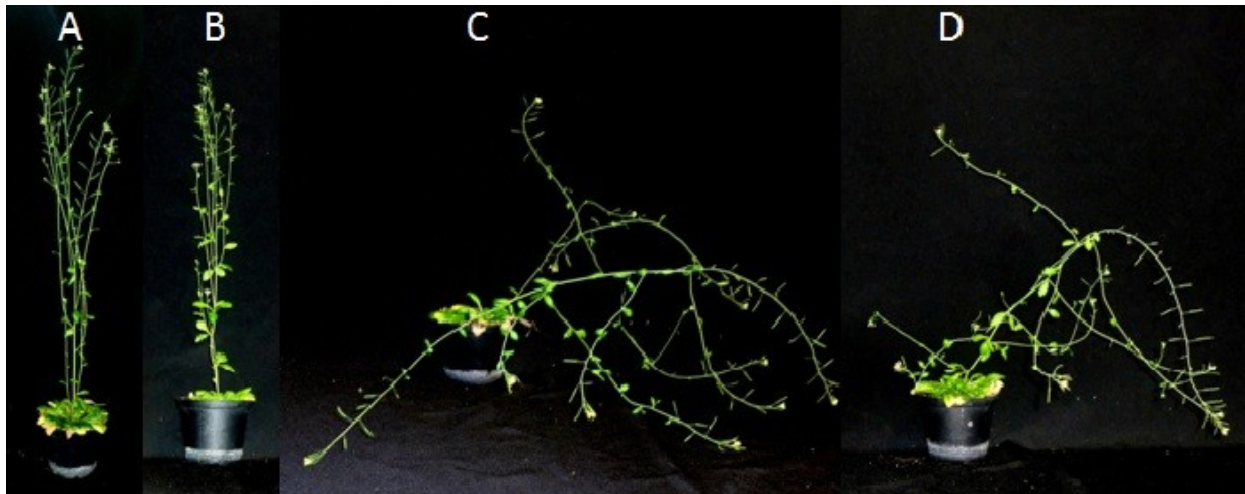


Abbildung 3: Pflanzenmaterial von *Arabidopsis thaliana* für Komplementationsanalysen, A= Wildtyp Columbia-0, B= *attac1*-Einzelmutante, C= *atlazy1*-Einzelmutante, D= *attac1/atlazy1*-Doppelmutante

3.3 Phänotypisierung des Pflanzenmaterials

Die Merkmale Triebhaltung nach OIV 006 (Abbildung 4, <http://www.eu-vitis.de/docs/descriptors/oivdesc/OIV%20006.pdf?PHPSESSID=d435aa5012bca5d28dc1717ee8395f6b>) und Triebwinkel (Winkel zwischen Holzsteckling und Hauptspross) wurde in den Versuchsjahren 2015-2018 für alle Referenzweinrebsorten bei jeweils bis zu zehn Pflanzen bonitiert. Die Bonitur der Triebhaltung umschrieb hierbei die Neigung des Hauptsprosses mit einem Zahlenwert von 1 (aufrecht), 3 (halb aufrecht), 5 (waagrecht), 7 (halb hängend) bis zu 9 (hängend). Nach OIV 006 ist ein gemeinsamer Boniturzeitpunkt während der Blütezeit vor dem Anheften der Weinreben festgelegt.

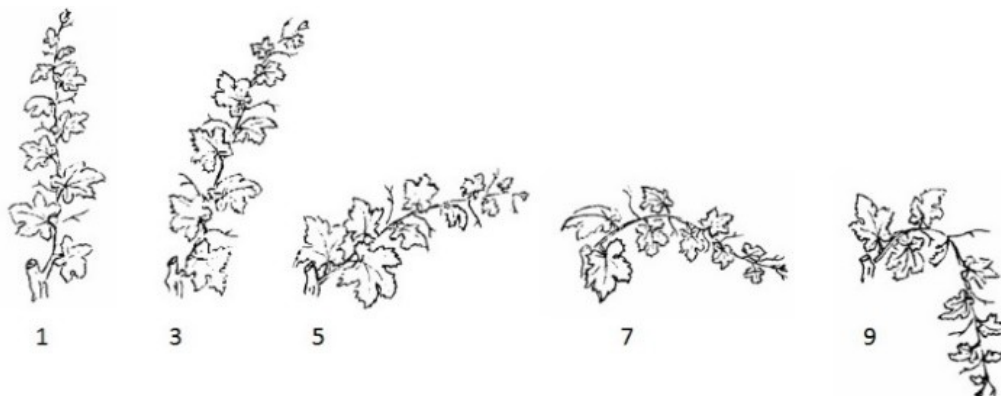


Abbildung 4: Triebhaltung von Weinrebsorten nach OIV 006 (<http://www.oiv.int/public/medias/2274/code-2e-edition-finale.pdf>)

Da die Weinreben aufgrund der frischen Anzucht aus Holzstecklingen im Frühjahr nicht blühten, wurde in den Versuchsjahren 2015-2016 ein gemeinsamer Boniturzeitpunkt nach 13-15 Wochen gewählt, sobald die Sorten sich in Hinblick auf ihre Triebhaltung deutlich unterschieden, jedoch bevor sie aufgrund einer zu großen Sprosslänge (>60 cm) eine zunehmend hängende Triebhaltung ausbildeten. Aufgrund äußerer Einflussfaktoren (z.B. Licht und Temperatur) unterschied sich der kalendarische Boniturzeitpunkt in den jeweiligen Versuchsjahren.

In den Versuchsjahren 2017 und 2018 wurde ein optimaler Boniturzeitpunkt unter Gewächshausbedingungen auf eine Sprosslänge von 50-60 cm festgelegt und eine individuelle Bonitur jeder Einzelpflanze zu diesem Zeitpunkt durchgeführt. Hierbei wurden die Merkmale Triebhaltung, Sprossdurchmesser, Sprosslänge, Internodienlänge, Internodienanzahl und der Triebwinkel nach 5, 10 sowie 15 cm Sprosslänge erfasst (Abbildung 5).

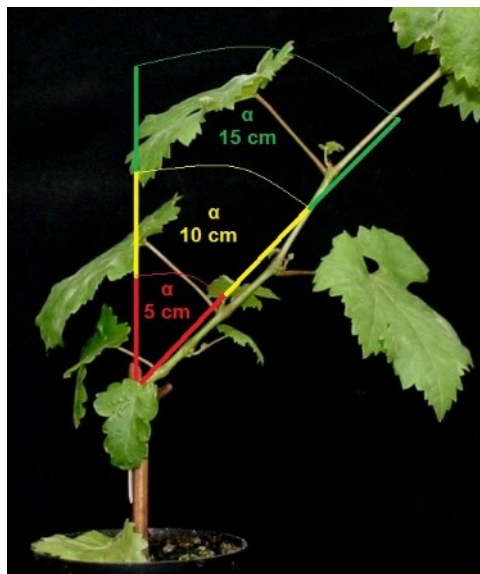


Abbildung 5: Beispielhafte Vermessung des Triebwinkels in 5, 10 und 15 cm Wuchshöhe

Erhobene Boniturdaten wurden abschließend mit Ergebnissen auf DNA- und RNA-Ebene korreliert und statistische Berechnungen mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit GraphPad Prism (Version 5.0, San Diego, CA, USA, www.graphpad.com) durchgeführt. Im Versuchsjahr 2017 wurde zusätzlich zu vier Terminen eine Bonitur von Triebwinkel und -haltung durchgeführt, um die Entwicklung dieser Merkmale über die Zeit betrachten zu können.

Um zu überprüfen, inwiefern die Referenzsorten ihr Wachstum entlang eines Gravitationsvektors ausrichten, wurde im Versuchsjahr 2018 jeweils eine Pflanze

jeder Referenzsorte nach dem Austrieb und dem Übersetzen auf Erde in Anlehnung an die Versuche von Yoshihara et al. (2013) entgegen ihrer normalen Orientierung um 180° gedreht aufgehängt und die Entwicklung des Sprosswachstums beobachtet. Eine Lichtquelle wurde unterhalb der Pflanzen installiert sowie eine Sonneneinstrahlung über Abdunkelung verhindert, um eine Einflussnahme des Phototropismus bei der möglichen Neuausrichtung des Sprosswachstums auszuschließen. Die Kultivierung erfolgte unter Gewächshausbedingungen.

3.4 DNA-Isolierung bei Weinreben und *Arabidopsis thaliana*

Die Isolierung von DNA aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem Protokoll von Doyle (1991) durchgeführt. DNA aus Weinrebenblattmaterial wurde methodisch nach dem Protokoll von Doyle (1991) extrahiert, jedoch der nach Gambino et al. (2008) beschriebene PVP-haltige Extraktionspuffer verwendet, welcher unter anderem Störstoffe wie Polyphenole entfernte.

3.5 Molekularbiologische Methoden für Sequenzanalysen

3.5.1 Sequenzanalysen zu *VviTAC1* und *VviLAZY1*

Ein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) der Pfirsichgene *PpeLAZY1* (XM_007223027.2) und *PpeTAC1* (KF218366.1) gegen die Genomsequenz von 'PN40024' (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) identifizierte die Gene *VviTAC1* (GSVIVG01027402001) und *VviLAZY1* (GSVIVG01010528001) als potentielle Kandidatengene, die einen Einfluss auf die Triebhaltung bei Wein haben könnten. Für die 13 Referenzsorten wurden auf genomischer DNA-Ebene sowie cDNA-Ebene, ebenso wie für die S1-Elternpflanzen der Sorten 'Spätburgunder FR 52-78', 'Spätburgunder Clevner', 'Trollinger S1' und 'Trollinger WE 4-7' auf genomischer DNA-Ebene, für die Kandidatengene *VviTAC1* (GSVIVG01027402001) und *VviLAZY1* (GSVIVG01010528001) Sequenzanalysen durchgeführt.

3.5.2 Polymerasekettenreaktion

PCR-Reaktionen, die eine hohe Genauigkeit erforderten, erfolgten mittels einer Phusion-Polymerase (Schwerte, Fisher Scientific GmbH) mit Proof-Reading-Aktivität nach Herstellerinstruktionen (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F530S>). Ein 25 µl PCR-Ansatz umfasste allgemein 14,30 µl ddH₂O, 0,50 µl dNTP's,

(10 mM) 5,00 µl 5x GC-Puffer, 1,00 µl Forward-Primer (10 µM), 1,00 µl Reverse-Primer (10 µM), 0,20 µl Phusion-Polymerase (5 U/µl) und 3,00 µl DNA (25 ng/µl). Das PCR-Programm bestand aus einer einmaligen Denaturierung (98 °C, 2:00 min), 25-40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (98 °C, 0:30 min), Primerannealing (55-60 °C, 0:30 min) und Polymerisation (72 °C, 0:30 min pro 1 kb) und einer abschließenden Elongation (72 °C, 5:00 min).

PCR-Reaktionen ohne Bedarf einer Proof-Reading-Aktivität wurden mit der FIREPol® DNA Polymerase (Solis BioDyne OÜ, Tartu, Estland) nach Herstellerinstruktionen (<https://www.solisbiodyne.com/EN/products/pcr/firepol>) und einem 25 µl Ansatz von 14,30 µl ddH₂O, 0,50 µl dNTP's, (10 mM) 2,50 µl B-Puffer (0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄), 2,50 µl MgCl₂ (25 mM), 1,00 µl Forward-Primer (10 µM), 1,00 µl Reverse-Primer (10 µM), 0,20 µl FIREPol® DNA Polymerase (5 U/µl) und 3,00 µl DNA (25 ng/µl) durchgeführt. Das PCR-Programm bestand aus einer einmaligen Denaturierung (94 °C, 2:00 min), 25-40 Zyklen bestehend aus Denaturierung (94 °C, 0:30 min), Primerannealing (55-60 °C, 0:30 min) und Polymerisation (72 °C, 0:30 min pro 500 bp) sowie einer abschließenden Elongation (72 °C, 5:00 min).

Für eine Amplifizierung der Kandidatengene für Sequenzanalysen wurden die Primer V1/V11 für *VviTAC1* (GSVIVG01027402001, 3371 bp) sowie V12/V24 für *VviLAZY1* (GSVIVG01010528001, 4388 bp) verwendet. Die Sequenzanalysen auf cDNA-Ebene erforderten eine PCR mit den Primerkombinationen V40/V41 für *VviTAC1* (876 bp) sowie V42/V43 für *VviLAZY1* (1146 bp). Sämtliche Primer sind in Tabelle 4 aufgeführt.

3.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung, Aufreinigung, A-Tailing und Ligation

Auf eine PCR folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Produkte über ein Agarosegel in 1xTAE-Puffer unter Verwendung der Geräte Mini-Sub Cell GT System sowie PowerPac 3000 Power Supply und der Dokumentation mittels Gel Doc™ EZ Gel Documentation System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Bei Bedarf wurden die entsprechenden Gelbanden erwarteter Größe ausgeschnitten und nach Herstellerinstruktionen (https://si.vwr.com/assetsvc/asset/sl_SI/id/17035086/contents) mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit (Erlangen, VWR Life Science Competence Center) aufgereinigt. Falls den geschaffenen blunt-ends der Phusion-Polymerase ein Adenin-Überhang angefügt werden musste, der eine anschließende Ligation mit einer T4-DNA-Ligase (Mannheim, Promega GmbH) z.B. in das pGEM®-T Easy

Vector System (Abbildung A 4) (Mannheim, Promega GmbH) mit Thymin-Überhang gewährleistet, wurde dies mit der FIREPol® DNA Polymerase bewerkstelligt. Das A-Tailing umfasste hierbei einen Ansatz von 2,5 µl B-Puffer (0.8 M Tris-HCl, 0.2 M (NH₄)₂SO₄), 2,5 µl MgCl₂ (25 mM), 5,0 µl 1 mM dATP, 0,5 µl FIREPol® DNA Polymerase (5 U/µl) und 14,5 µl Geleluat. Der Ansatz wurde für 30 min bei 72 °C inkubiert.

Ein Ligationsansatz umfasste entsprechend der Herstellerangaben (<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/product-information-sheets/g/t4-dna-ligase-blue-white-cloning-qualified-protocol.pdf>) allgemein 4 µl H₂O, 1 µl 10x Ligasepuffer, 1 µl Vektor, 1 µl T4-Ligase (Promega GmbH, Mannheim) und 3 µl DNA-Fragment, welcher über Nacht bei 8 °C inkubiert wurde.

3.5.4 Herstellung chemisch kompetenter Zellen

Auf eine Ligation folgte eine Transformation von *E. coli* oder Agrobakterien. Die Transformation stellt eine grundlegende Methode dar (Cosloy und Oisihi 1973) und konnte über chemische Kompetenz der Zellen mittels CaCl₂ ermöglicht werden, welches Bakterien befähigt Fremd-DNA aufzunehmen (Mandel und Higa 1970).

Für die Erzeugung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen (DH5α) wurden diese in SOB-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,058 % NaCl, 0,018 % KCl) bei 37 °C auf eine OD₆₀₀ = 0,6 angezogen, für 10 min auf Eis abgekühlt sowie für 10 min bei 4100 U/min und 4 °C abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde der Zellrückstand in 80 mM MgCl₂ und 100 mM CaCl₂ in 20 % Glycerol resuspendiert. Es wurde erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand mit 0,1 M CaCl₂ in 20 % Glycerol resuspendiert. Die Zellen wurden abschließend aliquotiert und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.5.5 Transformation von *E. coli* über Hitzeschock und Elektroporation

Für eine Hitzeschock-Transformation wurden kompetente DH5α Zellen auf Eis angetaut (5 min), mit 10 µl Ligationsansatz vermischt und auf Eis gehalten (30 min). Es folgte ein Hitzeschock (42 °C, 1:30 min) und eine Inkubation auf Eis (5 min). Nach der Zugabe von 600 µl SOC-Medium (2 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,01 M NaCl, 2,5 mM KCl, 0,1 M MgCl₂, 0,02 M Glucose) wurden die Zellen bei 37 °C (60 min) inkubiert und der Transformationsansatz unter sterilen Bedingungen auf LB-Agar-X-

Gal-IPTG-Platten (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 1,5 % Agar, 0,005 % X-Gal, 0,0025 % IPTG) mit entsprechenden Antibiotika ausgestrichen (pGEM®-T Easy Vector System Ampicillinresistenz, vLR2-Vector Kanamycinresistenz, pCambia2301_GVA-Vector Kanamycinresistenz). Ein Wachstum der Zellen bei 37 °C (16-18 h), ermöglichte über das pGEM®-T Easy Vector System (Mannheim, Promega GmbH) eine Blau-Weiß-Selektion (Julin 2018). Positive Zellen wurden über Vektor-spezifische Primer (SP6/T7 für pGEM®-T Easy Vector System, V121/V122 für vLR2-Konstrukt, V123/V124 für GVA-Konstrukt) oder geninternen Primer verifiziert (Tabelle 4).

Für eine Transformation mittels Elektroporation wurden DH5α Zellen frisch bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen, jedoch ohne diese wegzufrieren oder auf Eis zu halten (Tu et al. 2016). Es folgte die Zugabe von 5 µl Ligationsansatz zu 50 µl Zellen. Unter Verwendung einer 1 mm Elektroporationsküvette (PepLab Brand, Wertheim) sowie den Bedingungen von 1,8 kV/cm (elektrische Feldstärke), 5 ms Pulszeit, 200 Ω (Widerstand) und 25 µF (elektrische Kapazität) erfolgte die Transformation über einen Elektroschock im Elektroporator (MicroPulser Electroporator, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Hierauf wurden 500 µl Nährmedium (LB-Medium für *E. coli*, YEB-Medium für Agrobakterien) zugegeben, bei 28 °C (Agrobakterien) bzw. 37 °C (*E. coli*) für 60 min inkubiert und jeweils unter sterilen Bedingungen auf LB- bzw. YEB-Festnährmedium ausgestrichen.

3.5.6 Plasmid-Minipräparation und Sequenzanalysen

Per Inserttest-PCR positiv getestete Zellen wurden in Flüssig-LB-Medium auf einem Schüttellinkubator (IKA Schüttler KS 4000 i control, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) angezogen (18 h, 37 °C, 160 U/min) und anschließend mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini TwoKit (Strattec Molecular, Berlin) nach Herstellerinstruktionen (<https://www.molecular-strattec.com/products/details/invisorb-spin-plasmid-mini-two>) die Plasmid-DNA isoliert. Abschließende Sequenzanalysen wurden von den Firmen GATC-BIOTECH/Eurofins (<https://www.eurofinsgenomics.eu/de/custom-dna-sequencing/gatc-services/>) sowie GENEWIZ (<https://www.genewiz.com/en-GB/Public/Services/Sanger-Sequencing>) durchgeführt. Es wurden 100 ng/µl DNA in einem Volumen von 5 µl eingesetzt und die Auswertung der Sequenzdaten mit dem Programm BioEdit (Version 7.2.3) (Hall 1999) vorgenommen. Für Sequenzanalysen und PCR-Verifizierung positiver Klone auf genomischer DNA-Ebene für VviTAC1

wurden die Forward-Primer V2-V5 sowie die Reverse-Primer V6-V9 und für *VviLAZY1* die Forward-Primer V14-V18 sowie die Reverse-Primer V19-V23 und auf cDNA-Ebene die Primer SP6/T7 (Tabelle 4) verwendet.

3.6 RNA-Isolierung bei Weinreben

Das RNA-Extraktionsprotokoll nach Gambino et al. (2008) ermöglichte die Entfernung von Störstoffen wie Polyphenolen und Polysacchariden und somit eine RNA-Extraktion in hoher Qualität und Quantität, weshalb diese Methode für alle durchgeführten Isolierungen verwendet wurde. Für die Extraktionen wurden einmalig sterilisierte Glas- und Plastikwaren benutzt sowie extrahierte RNA abschließend in 100 µl TE-Puffer aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

3.7 Transkriptanalysen für *VviTAC1* und *VviLAZY1*

3.7.1 Probennahme für die Transkriptanalysen

Für die Untersuchung des Zusammenhangs von Triebhaltung und der Genexpression von *VviTAC1* und *VviLAZY1* bei Weinreben, wurden semiquantitative Transkriptanalysen durchgeführt. Es wurden drei Untersuchungszeitpunkte betrachtet. Boniturzeitpunkt I wurde kurz nach dem Austrieb der Pflanze bei einer Sprosslänge von 2-3 cm festgelegt. Hierbei wurden die Sprossspitze, zwei darunterliegende Nodien sowie die drei dazugehörigen Internodien im März 2017 ohne biologische Wiederholung für alle Referenzsorten beprobt.

Für Boniturzeitpunkt II wurden die Pflanzenteile Blatt, Internodium und Nodium untersucht. Bei einer Sprosslänge von 50-60 cm wurden beginnend im apikalen Sprossbereich nach basal jeweils die ersten fünf Blätter, Internodien bzw. Nodien im Mai 2017 alle Referenzsorten ohne biologische Wiederholung beprobt.

Für Boniturzeitpunkt III wurden die Pflanzenteile Internodium und Nodium mit jeweils sieben Proben von apikal nach basal über die gesamte Länge des nicht verholzten Hauptsprosses bei einer Sprosslänge von 50-60 cm für die Referenzsorten 'Monastrell', 'Merzling', 'Vermantino', 'Regent', 'Aramon Noir' und 'Couderc 3309' im Mai 2018 mit dreifacher biologischer Wiederholung beprobt.

Alle Probennahmen (Abbildung 6) erfolgten vormittags, falls möglich am selben Tag und wurden umgehend in flüssigen Stickstoff weggefroren sowie bei -80 °C gelagert.

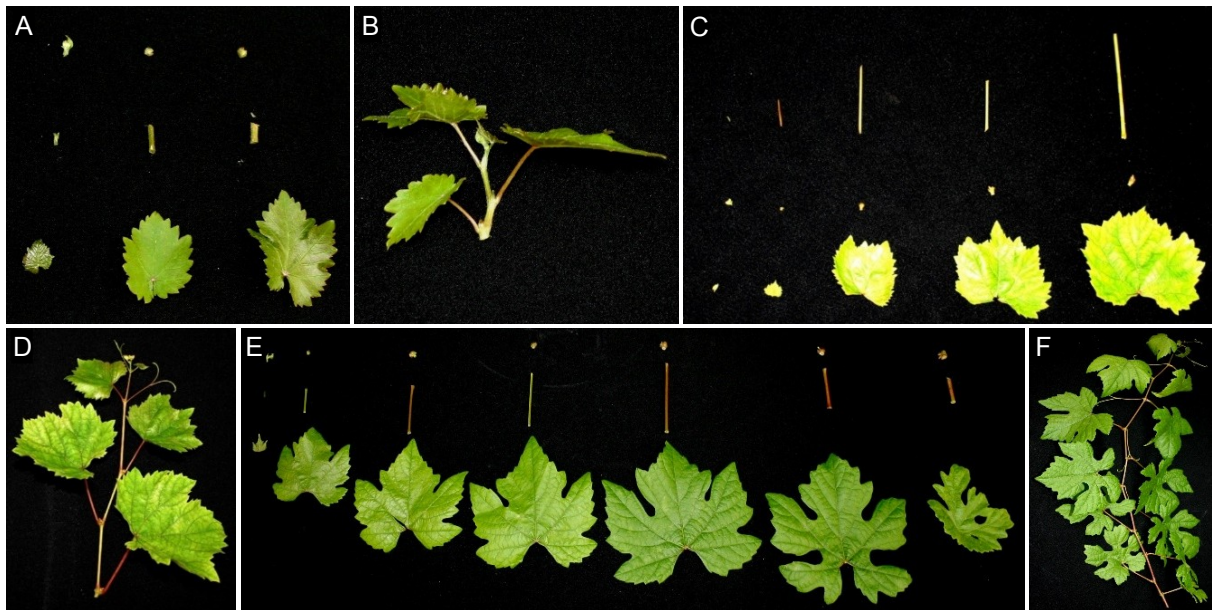


Abbildung 6: Probennahme für Pflanzenmaterial von Nodien, Internodien und Blättern für Transkriptanalysen bei der Weinrebe zu drei Boniturzeitpunkten, A= Untersuchte Nodien und Internodien mit dazugehörigen Blättern für Boniturzeitpunkt I, B= Gesamte Pflanze für Boniturzeitpunkt I, C= Untersuchte Nodien, Internodien und Blätter für Boniturzeitpunkt II, D= Apikaler Sprossbereich für Boniturzeitpunkt II, E= Untersuchte Nodien und Internodien mit dazugehörigen Blättern für Boniturzeitpunkt III, F= Gesamte Pflanze für Boniturzeitpunkt III

3.7.2 Herstellung cDNA, cDNA-Abgleich und Transkriptanalysen

Im Anschluss an die RNA-Isolierung folgte ein *DNaseI*-Verdau (Schwerte, Fisher Scientific GmbH) nach Herstellerinstruktionen (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EN0525>) sowie eine reverse Transkription mittels RevertAid-Reverse-Transcriptase (Schwerte, Fisher Scientific GmbH) nach Herstellerinstruktionen (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/EP0441>). Für den Einsatz gleicher cDNA-Mengen bei den Transkriptanalysen wurde ein Abgleich mit den Primern V48/V49 für das Housekeeping-Gen *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* (*VviGAPDH*, NCBI-Sequenz-ID: XM_002263109.3) durchgeführt. Die anschließenden Transkriptanalysen erfolgten mit den Primerkombinationen V85/V86 für *VviTAC1* sowie V18/V24 für *VviLAZY1* (Tabelle 4).

3.8 Entwicklung von biologischen Markern für *VviTAC1* und *VviLAZY1*

3.8.1 CAPS-Marker bei den Referenzsorten

Über Sequenzanalysen identifizierte SNP's, welche einen AS-Austausch nach sich zogen, sollten verifiziert werden. Es wurden Restriktionsverdau nach Herstellerinstruktionen durchgeführt (Tabelle 1), SNP's bestätigt und somit CAPS-Marker (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) abgeleitet (Tabelle 8). Der

Verdau erfolgte über Nacht, wobei in Abhängigkeit der eingesetzten DNA-Menge 5-10 Units Enzym eingesetzt wurden.

Tabelle 8: Entwicklung von CAPS-Markern für detektierte SNP's, die einen Aminosäureaustausch nach sich zogen

Gen	AS-Austausch	Austausch auf cDNA-Ebene	Restriktionsenzym
<i>VviTAC1</i>	A85T	G253A	<i>RsaI</i>
<i>VviTAC1</i>	L103V	C307G	<i>Hpy166II</i>
<i>VviTAC1</i>	P146R	C437G	<i>HinfI</i>
<i>VviTAC1</i>	R189K	G566A	<i>MseI</i>
<i>VviLAZY1</i>	D69E	C207A	<i>ApoI</i>

Für den Verdau wurde eingehend eine PCR mit den Primern V40/V41 für *VviTAC1* sowie V42/V43 für *VviLAZY1* durchgeführt (Tabelle 4). Als Template-DNA dienten 500 ng cDNA der Referenzsorten.

3.8.2 CAPS-Marker in spaltenden S1-Populationen von 'Merzling' und 'Regent'

Für 'Couderc 3309' wurde auf Grundlage genomischer Sequenzanalysen für den Austausch D69E (D69E-Allel) bei *VviLAZY1* ein homozygoter Zustand vermutet. 'Merzling' und 'Regent' besaßen dieses Allel sowie ein zum Referenzgenom identisches Allel ('PN40024'-Allel) und waren somit heterozygot (siehe Kapitel 4.2). Es sollte festgestellt werden, inwiefern der Zygotie-Zustand des D69E-Allels die Triebhaltung in den S1-Populationen von 'Merzling' und 'Regent' bestimmt. In den S1-Populationen wurde die Triebhaltung nach OIV 006 bestimmt sowie mittels des Restriktionsenzym *ApoI* auf die Existenz des D69E-Allels getestet. Je nach Vorhandensein wurden nach einer PCR mit genomischer DNA sowie den Primern V18/V24 folgende Restriktionsmuster erwartet:

- D69E-Allel homozygot vorliegend: 273, 301, 351 und 458 bp
- AS-Austausch D69E heterozygot vorliegend: 273, 301, 351, 458 und 731 bp
- AS-Austausch D69E nicht vorliegend: 301, 351 und 731 bp

3.8.3 PCR-Marker in einem Weinrebensortiment

Innerhalb von *VviLAZY1* wurde bei den Sorten 'Merzling', 'Regent' und 'Couderc 3309' beim Vorhandensein des D69E-Allels im Intronbereich eine 20 bp große Insertion detektiert. Innerhalb eines Weinrebensortiments mit Sorten aufrechter und hängender Triebhaltung sollte die Kopplung der Insertion in Bezug auf das Merkmal

Triebhaltung überprüft werden. Hierzu wurde eine PCR mit den Primern V45/V24 für das 'PN40024'-Allel sowie mit den Primern V44/V24 für das D69E-Allel durchgeführt, welche spezifisch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit der Insertion anzeigten.

3.9 SSR-Analysen und Phänotypisierung in segregierenden S1-Populationen

Für die spaltenden S1-Populationen 'Trollinger S1' (Triebhaltung aufrecht), 'Trollinger WE 4-7' (Triebhaltung standard), 'Spätburgunder Clevner' (Triebhaltung aufrecht) und 'Spätburgunder FR 52-78' (Triebhaltung standard) einer offenen Abblüte wurde der Zusammenhang zwischen der Triebhaltung und den Genloci *VviTAC1* (GSVIVG01027402001, Chr. 15) sowie *VviLAZY1* (GSVIVG01010528001, Chr. 1) untersucht. Das Material wurde mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Primern GF01-09 (1,03 cM Entfernung zu *VviTAC1*) und GF15-05 (0,17 cM Entfernung zu *VviLAZY1*) am Institut für Rebenzüchtung (Geilweilerhof) genotypisiert und sortenfremdes Material mit den Primern GF01-15, GF01-10, GF01-14, VMC8G3.2 und VVS2 aussortiert (Tabelle A 3).

Für die SSR-Analysen wurden PCR-Ansätze mit 2,5 µl Peqlab Mastermix (Erlangen, VWR Life Science Competence Center), 0,02 µl Forward-Primer (100 pmol/µl), 0,02 µl Reverse-Primer (100 pmol/µl), 1,46 µl ddH₂O und 1,00 µl DNA (1 ng/µl) angesetzt sowie ein PCR-Programm bestehend aus einer einmaligen Denaturierung (95 °C, 3:00 min), 30 Zyklen bestehend aus Denaturierung (95 °C, 0:15 min), Primerannealing (60 °C, 0:30 min) und Polymerisation (72 °C, 0:30 min) und einer abschließenden Elongation (72 °C, 7:00 min) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde denaturiert (95 °C, 5:00 min), 1:20 mit ddH₂O verdünnt und 1 µl der Verdünnung mit 1 µl des Größenstandards 500 LIZ dye size standard (Fisher Scientific GmbH, Schwerte) vermischt. Es folgte eine Analyse mit dem APPLIED BIOSYSTEMS 3130 xl GENETIC ANALYZER (Applera Deutschland GmbH, Darmstadt) und Auswertung mit dem Programm GENEMAPPER Version 4.0 (Applied Biosystems, Darmstadt). Die Boniturdaten (Triebhaltung) und SSR-Analysen wurden abschließend über einen Pearson-Test ausgewertet und Korrelationsanalysen für den Zusammenhang von Triebhaltung und den SSRs zu den Kandidatengenomen ermöglicht.

3.10 Komplementationsanalysen in *Arabidopsis thaliana*

3.10.1 Konstrukterstellung pGreenII 0179 und pGreenII 0229

Aus den hergestellten cDNA-Konstrukten für *VviTAC1* und *VviLAZY1* wurden Haplotypen ermittelt, welche dem Referenzgenom 'PN40024' entsprachen oder auch zahlreiche Unterschiede aufwiesen. Jeweils drei Haplotypen der Kandidatengene wurden für Komplementationsanalysen mit *A. thaliana* verwendet (Tabelle 9). Die ausgewählten cDNA-Konstrukte, welche im pGEM®-T Easy Vector System durch Klonierung vorlagen, umfassten das Start- und Stoppcodon der Kandidatengene als auch die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI und *Sac*I für *VviTAC1* sowie *Bam*HI und *Hind*III für *VviLAZY1* am 5'- bzw. 3'-Ende. Die Schnittstellen wurden den cDNA-Konstrukten über eine PCR mit den Primern V40/V41 (*VviTAC1*) und V42/V43 (*VviLAZY1*) angefügt und erlaubten über einen Restriktionsverdau eine Klonierung in eine gleichartig geschnittene 35S-CaMV-Kassette (Abbildung 7).

Tabelle 9: Ausgewählte Haplotypen von *VviTAC1* und *VviLAZY1* für Komplementationsanalysen in *Arabidopsis thaliana*

Gen	Haplotyp	Veränderungen im Vergleich zu 'PN40024' auf Aminosäureebene
<i>VviLAZY1</i>	1	Referenzgenom 'PN40024'
	2	D69E
	3	D69E, T173I
<i>VviTAC1</i>	1	Referenzgenom 'PN40024'
	2	L103V, E111K, E116V, R149P, R189K, D193N, P194S, P207L, S263N
	3	L103V, P146R, R149P, R189K, D193N, P207L, Q259R

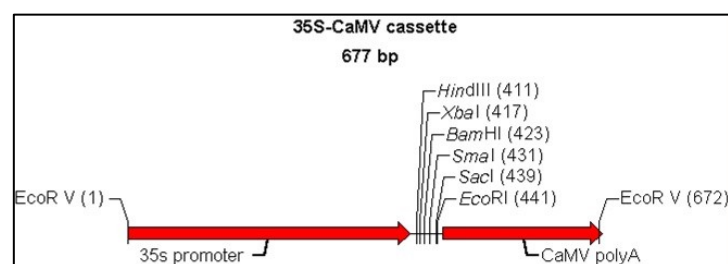


Abbildung 7: 35S-CaMV-Kassette

Die Restriktionsverdaus erfolgten nach Herstellerangaben (Tabelle 1).

Die Klonierungsprodukte wurden gelelektrophoretische aufgetrennt, ausgeschnitten und *E. coli* (DH5α) damit transformiert. Nach der Plasmid-Minipräparation folgte ein Restriktionsverdau mit *EcoRV* und eine Klonierung in die gleichartig geschnittenen Vektoren pGreenII 0179 (Abbildung A 5) für *VviTAC1* und pGreenII 0229 (Abbildung A 6) für *VviLAZY1*. Vektoren mit dem pGreen-backbone besitzen generell eine

Kanamycin-Resistenz (Hellens et al. 2000). Der Vektor pGreenII 0179 besitzt zudem eine Hygromycin- und pGreenII 0229 eine Bialaphos-Resistenz. Die Vektoren wurden abschließend wie bei Höfgen und Willmitzer (1988) beschrieben in den Agrobakterienstamm GV3101 (besitzt zusätzlich Rifampicin und Gentamycin-Resistenz), welches das Helferplasmid pSOUP (Abbildung A 7) mit der Resistenz für Tetrazyklin trägt, eingeführt und auf YEB-Festmedium-Platten (0,5 % Fleischextrakt, 0,1 % Hefeextrakt, 0,5 % Saccharose, 0,5 % Trypton, 0,01 M MgSO₄, 1,5 % Agar, pH 7,2) unter sterilen Bedingungen und unter Zugabe der Antibiotika Rifampicin (50 µg/ml), Tetrazyklin (2 µg/ml), Gentamycin (25 µg/ml) und Kanamycin (50 µg/ml) ausgestrichen. Positive Kolonien wurde über eine Inserttest-PCR mit den Primern V40/V41 (*VviTAC1*) und V42/V43 (*VviLAZY1*) verifiziert (Tabelle 4).

3.10.2 Transformation von *Arabidopsis thaliana* über Floral dip

Es wurde Saatgut von *Arabidopsis thaliana* für den Wildtyp Columbia-0 sowie der Einzelmutanten *attac1* und *atlazy1* ausgesät, für einen Tag bei 4 °C eine Kältebehandlung (Stratifizierung) durchgeführt, nach einer Woche pikiert und die nach ca. 10-12 Wochen blühenden Pflanzen (14 h/10 h Tag-Nacht-Rhythmus, 22 °C) in Orientierung am Protokoll von Zhang et al. (2006) transformiert. Hierzu wurden Agrobakterien mit dem gewünschten Konstrukt zwei Tage bei 28 °C in YEB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika auf einem Schüttelinkubator (IKA Schüttler KS 4000 i control, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) angezogen. Die Zellsuspension wurde nach einer erreichten OD₆₀₀ von 1,0 für 15 min bei 5000 U/min zentrifugiert, der Überstand verworfen und der Rückstand in 5%iger Saccharoselösung und 0,05 % Silvet Gold resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 2 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Blüten der *attac1*-Mutanten in Zellsuspension mit *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukt, die *atlazy1*-Mutanten in Zellsuspension mit *VviLAZY1*-Überexpressionskonstrukt und der Wildtyp in eine der beiden Zellsuspensionen für wenige Sekunden getaucht. Die Pflanzen wurden hierauf folgend eingetütet, um das Saatgut aufzufangen, und bis zur Ernte kultiviert.

3.10.3 Selektion und Charakterisierung der Transformanten

Das erhaltene Saatgut wurde für die *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukte bis in die T3-Generation weitergeführt. Für *VviLAZY1* konnten keine positiven Pflanzen selektiert werden. Falls notwendig wurde das Saatgut mittels 70 % Ethanol dreimalig

gewaschen und sterilisiert. Es folgte eine Selektion in Orientierung an das Protokoll von Harrison et al. (2006). Das sterilisierte Saatgut der T3-Generation für *VviTAC1*-Konstrukte wurde auf Hygromycin-haltigen (15 µg/ml) MS-Nährmediumplatten (0,8 % Agar, 1,0 % Saccharose, 1x MS inkl. Vitamine) unter sterilen Bedingungen ausgesät. Die Samen wurden anschließend zwei Tage bei 4 °C in Dunkelheit (Stratifikation) und 4 h bei kontinuierlichem Licht (Germination) kultiviert. Es schloss sich eine Inkubation für zwei Tage in Dunkelheit bei 22 °C und Kultivierung unter Langtagbedingungen (Licht 14 h, Nacht 10 h) bei 22 °C an. Positive Transformanten zeigten ein Hypokotylwachstum von 0,8-1,0 cm und negative eines von 0,2-0,4 cm. Pflanzen mit *VviLAZY1*-Überexpressionskonstrukt konnten auf Erde ausgesät und mit Bialaphos (0,2 mg/ml, Bayer AG, Leverkusen) selektiert werden. Selektierte Pflanzen wurden im Anschluss an eine DNA-Extraktion über eine Inserttest-PCR mit den Primern V85/V86 (*VviTAC1*) und V18/V24 (*VviLAZY1*) überprüft. Der Genotyp der *attac1*- (V29/V31), *atlazy1*-Einzelmutanten (V34/V36) und Columbia-0 für *AtTAC1* (V29/V30) sowie *AtLAZY1* (V34/V35) wurde ebenfalls verifiziert (Tabelle 4). Positiv selektierte Pflanzen in der T3-Generation wurden für die Merkmale Blattlänge und Blattbreite nach 10 Wochen sowie für die Verzweigungswinkel nach 12 Wochen Wachstum im Rahmen der Masterarbeit von Popiolkowski (2018) phänotypisiert.

3.11 Proteinstruktur von *VviTAC1* und *VviLAZY1* und Promotorbereich

Ein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) stellt ein unverzichtbares Werkzeug dar, um Sequenzabfolgen miteinander zu vergleichen bzw. nach diesen zu suchen (Altschul et al. 1990). Über einen Protein-BLAST der Internetplattform NCBI (Altschul 1997, Altschul et al. 2005, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurde nach zu *VviTAC1* (GSVIVG01027402001) und *VviLAZY1* (GSVIVG01010528001) homologen Proteinsequenzen bei weiteren Pflanzenarten gesucht. TAC1 und LAZY1 gehören zur Familie der IGT-Proteine (Dardick et al. 2013) und besitzen für TAC1 vier bzw. für LAZY1 fünf konservierte Domänen. Insofern diese Domänen vorlagen, wurde ein Protein als zu TAC1 bzw. LAZY1 homolog angesehen. Die identifizierten Proteinsequenzen sind mit ihrer Annotierung in der NCBI-Datenbank in Tabelle A 1 und Tabelle A 2 dargestellt und wurden mithilfe des Protein-Blast der NCBI-Datenbank (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) in Hinblick auf ihre Homologie verglichen.

Mittels des Programms I-TASSER (Zhang 2008; Roy et al. 2010; Yang et al. 2015, <https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) wurde die Proteinstruktur für VviTAC1 und VviLAZY1 vorhergesagt. Als Grundlage hierfür dienten die über die Phytozomedatenbank (Goodstein et al. 2012, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) zugänglichen DNA-Sequenzen von VviTAC1 (GSVIVG01027402001) und VviLAZY1 (GSVIVG01010528001). Die Grenzen des Transkriptes von VviTAC1 lagen auf der Internetplattform nicht korrekt zugewiesen vor, weshalb die Exongrenzen basierend auf den eigens durchgeführten cDNA-Sequenzanalysen korrigiert wurden. Die verwendeten Proteinsequenzen sind unter Abbildung A 10 und Abbildung A 11 einzusehen. Für eine Auswertung der vorhergesagten Proteinstrukturen wurden die Werte für C-score, TM-score und RMSD betrachtet. Mit Hilfe der Internetplattformen NLS-Mapper (Kosugi et al. 2009, http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi) und TMPred (Hofmann und Stoffel 1993, https://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html) wurden VviTAC1 und VviLAZY1 des Weiteren auf das Vorhandensein von NLS- und Transmembranmotiven überprüft. Abschließend wurde mittels New Place (Higo et al. 1999, <https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) der Promotorbereich auf das Vorhandensein seiner Elemente untersucht.

3.12 Agroinfiltration bei Weinreben

3.12.1 GLRaV2-Konstrukterstellung für VviTAC1, VviLAZY1 und VviPDS

Abgeleitet vom *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRaV-2) aus der Familie der *Closteroviridae* wurde in der Arbeitsgruppe von Valerian Dolja (Oregon University, USA) das vLR2-GFP-Vektorkonstrukt erzeugt und der Universität Rostock zur Verfügung gestellt. Dieses Vektorsystem besitzt eine Kanamycinresistenz als Selektionsmarker sowie einen für GFP kodierenden DNA-Bereich. Es ist dazu in der Lage, sich über das Phloem in der Pflanze zu verteilen und einen regulierenden Einfluss auf die Expression bei der Weinrebe zu nehmen (Kurth et al. 2012).

Für den Knockdown der Gene VviTAC1 (GSVIVG01027402001), VviLAZY1 (GSVIVG01010528001) und VviPDS (GSVIVT01016650001) wurden PCR-Amplifikate von Exon-Genbereichen in sense-Richtung über die Primerkombinationen V115/V116 (VviTAC1, 322 bp), V117/V118 (VviLAZY1, 336 bp) und V119/V120 (VviPDS, 341 bp) erzeugt, welche bei einer Expression in der Pflanze Virus Induced Gene Silencing (VIGS) auslösen. Die Primer besitzen am 5'-

Ende zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle für *FseI* oder *PacI*. Die PCR-Amplifikate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und ausgeschnitten, aufgereinigt, einem A-Tailing unterzogen, ins pGEM®-T Easy Vector Systems kloniert, *E. coli* (DH5α) damit transformiert (Hitzeschock) und nach Anlegen einer LB-Medium-Flüssigkultur positive Klone (Inserttest-PCR mit genspezifischen Primern V115-V120) einer Plasmid-Minipräparation mit dem Invisorb Spin Plasmid Mini TwoKit unterzogen. Es folgte ein Doppel-Verdau der Vektorkonstrukte mit *FseI* (<https://international.neb.com/products/R0588-FseI#Product%20Information>) und *PacI* (<https://www.neb.com/products/r0547-paci#Product%20Information>) nach Herstellerinstruktionen. Die Restriktionsprodukte wurden wiederum gelelektrophoretisch aufgetrennt, Banden erwarteter Größe für *VviTAC1*, *VviLAZY1* und *VviPDS* ausgeschnitten, aufgereinigt und in einen gleichartig geschnittenen leeren vLR2-Vektor mittels T4-DNA-Ligase eingefügt. Die Vektorkonstrukte vLR2-*VviTAC1*, vLR2-*VviLAZY1*, vLR2-*VviPDS* und vLR2-GFP (leerer Kontrollvektor) wurden abschließend in den Agrobakterienstamm GV3101_pSoup transformiert (Elektroporation), auf YEB-Kanamycin-Platten selektiert und positive Klone über eine genspezifische (V115-V120) sowie vektorspezifische (V121/V122) Inserttest-PCR bestätigt (Tabelle 4). Die Vektorkarte ist in Abbildung A 8 dargestellt.

3.11.2 GVA-Konstrukterstellung für *VviTAC1*, *VviLAZY1* und *VviPDS*

Für Gene-Silencing-Experimente bei der Weinrebe wurde ausgehend vom *Grapevine virus A* (GVA) aus der Familie der *Flexiviridae* in der Arbeitsgruppe von Munir Mawassi (The Plant Pathology Department, Agricultural Research Organization, Bet Dagan, Israel) der VIGS basierte Vektor pCambia2301_GVA abgeleitet und zur Verfügung gestellt (Muruganantham et al. 2009).

Für ein RNA-Silencing der Gene *VviTAC1*, *VviLAZY1* und *VviPDS* wurden PCR-Amplifikate des kodierenden Bereiches in antisense-Richtung über die Primerkombinationen V103/V104 (*VviTAC1*, 298 bp), V105/V106 (*VviLAZY1*, 314 bp) und V107/V108 (*VviPDS*, 342 bp) erzeugt, welche bei einer Expression in der Pflanze Virus Induced Gene Silencing (VIGS) auslösen sollen. Es folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate, die Aufreinigung der betreffenden Banden, ein A-Tailing, Klonierung in das pGEM®-T Easy Vector System, Transformation in *E. coli* (Selektionsmarker Ampicillin), Inserttest-PCR mit den jeweiligen Primerkombinationen von V103-V108 sowie eine Plasmid-

Minipräparation. Hierauf wurde mittels der vektorspezifischen Schnittstellen *NotI* (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER0591>) und *Apal* (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/ER1411>) ein Doppelverdau nach Herstellerinstruktionen durchgeführt. Es wurde eine Klonierung in einen gleichartig geschnittenen pCambia2301_GVA-Vektor mittels T4-DNA-Ligase sowie Transformation in *E. coli* (Selektionsmarker Kanamycin) mit folgender Plasmid-Minipräparation angeschlossen. Die Vektorkonstrukte pCambia2301_GVA-VviTAC1, pCambia2301_GVA-VviLAZY1, pCambia2301_GVA-VviPDS und pCambia2301_GVA (leerer Kontrollvektor) wurden abschließend in den Agrobakterienstamm GV3101_pSoup transformiert (Elektroporation), auf YEB-Kanamycin-Platten selektiert und positive Klone über eine genspezifische (V103-V108) und vektorspezifische Inserttest-PCR (V123/V124) bestätigt (Tabelle 4). Die Vektorkarte ist in Abbildung A 9 dargestellt.

3.12.3 Agroinfiltration bei Weinreben und Tabak (*Nicotiana tabacum*)

Für die Agroinfiltration der Weinreben mit den hergestellten GLRaV2-Konstrukten wurden die Sorten ‘Monastrell’ und ‘Merzling’ als stark aufrechte Sorten, ‘Vermantino’ und ‘Aramon Noir’ als waagerechte bis halb hängende Sorten sowie ‘Syrah’ und ‘Cabernet Franc’, als Sorten für welche die Infiltration erfolgreich getestet wurde (Kurth et al. 2012), ausgewählt. Für die Sorten wurden die in Tabelle 10 gezeigten GLRaV-2-Konstrukte und Anzahl an Pflanzen verwendet.

Tabelle 10: Agroinfiltration ausgewählter Weinrebsorten mit GLRaV-2-Konstrukten

Weinrebsorte	vLR2-VviTAC1	vLR2-VviLAZY1	vLR2-GFP (leer)
‘Monastrell’	-	10 Pflanzen	10 Pflanzen
‘Merzling’	-	10 Pflanzen	10 Pflanzen
‘Vermantino’	10 Pflanzen	-	10 Pflanzen
‘Aramon Noir’	10 Pflanzen	-	10 Pflanzen
‘Syrah’	10 Pflanzen	10 Pflanzen	10 Pflanzen
‘Cabernet Franc’	10 Pflanzen	10 Pflanzen	10 Pflanzen

Die Infiltration erfolgte mit dem gleichen Pflanzenmaterial mittels zweier Methoden. Für beide Methoden wurde für jedes Konstrukt eine Agrobakterien-Suspension entsprechend der bereits beschriebenen Floral-dip-Methode auf eine OD₆₀₀ von 0,5 angezogen, abzentrifugiert, in Wasser aufgenommen und mit 0,5 % Silwet Gold vermischt. Aus einer Winterruhe stammende zurechtgeschnittene Holzstecklinge

wurden für 12 Stunden in dieser Agrobakterienzellsuspension eingelegt, um die Möglichkeit einer Infiltration über die frischen Schnittstellen des Holzes zu testen. Es folgte eine Oberflächensterilisation in 0,5%iger Chinosollösung (15 min) mit standardmäßiger Kultivierung unter Gewächshausbedingungen. Sobald die Pflanzen das Dreiblatt-Stadium erreichten, wurden die Pflanzen nach Beschreibung des Protokolls von Ben-Amar et al. (2013) ein zweites Mal infiltriert. Die Pflanzen wurden ohne weitere vorweggegangene Behandlung hierbei vormittags (geöffnete Stomata) in die Agrobakterien-Zellsuspension getaucht und unter Erzeugung eines Vakuums von 700 mPa mittels eines DURAN® Exsikkator (DWK Life Sciences GmbH, Wertheim am Main) für 2 min infiltriert. Sobald die Pflanzen eine Sprosslänge von 50-60 cm und somit den optimalen Boniturzeitpunkt erreichten, erfolgte eine Bonitur der Triebhaltung und -winkel.

Für die Agrobakterieninfiltration der Konstrukte pCambia2301_GVA-VviTAC1, pCambia2301_GVA-VviLAZY1 und pCambia2301_GVA wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 1,0 angezogen. Die Zellsuspension wurde anschließend über die Blattunterseite und somit den Stomata-Öffnungen mittels einer Einmalspritze (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) in zwei Wochen alten Pflanzen von *Nicotiana benthamiana* infiltriert und nach 3-4 Wochen die Auswirkungen auf den Phänotypen im Vergleich zu Kontrollpflanzen ausgewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Phänotypisierung der Weinrebenreferenzsorten

4.1.1 Visuelle Bonitur der Triebhaltung

Die Bonitur der Triebhaltung nach dem Boniturschlüssel OIV 006 unter Gewächshausbedingungen in den Jahren 2015 bis 2018 zeigte, dass die Referenzsorten ihre erwartete Triebhaltung nach 13-15 Wochen bei einer Sprosslänge von 50-60 cm erreichten und sich zu diesem Zeitpunkt am deutlichsten voneinander differenzierten bzw. signifikante Unterschiede aufwiesen. Aussagekräftige Stellvertreter der Bonitur der Triebhaltung für die Versuchsjahre 2015-2018 sind in Abbildung 9 sowie Abbildung A 12 bis Abbildung A 14 dargestellt. Die Linie 'PN40024' des Referenzgenoms zeigte eine waagerechte bis halb hängende Triebhaltung (Abbildung 8). Besonders die Sorten 'Monastrell', 'Merzling', 'Augster' zeigten über alle Versuchsjahre eine konstant aufrechte Triebhaltung und können als Modellpflanzen für die aufrechte Triebhaltung angesehen werden. Der Unterschied der halb aufrechten Sorten 'Sauvignon Blanc' und 'Muscat Ottonel' zu den waagerechten Sorten war zum Boniturzeitpunkt (50-60 cm Sprosslänge) als nur sehr gering einzuschätzen. Die Sorte 'Couderc 3309' zeigte hingegen stets eine sehr hängende Triebhaltung (Abbildung 9). Den Sorten 'Dattier de Beyrouth' und 'Aramon' wäre zu diesem Zeitpunkt anstatt einer halb hängenden Triebhaltung nach OIV 006 jedoch eher die Triebhaltung waagerecht zugeteilt worden.



Abbildung 8: Bonitur der Linie 'PN40024' der Sorte 'Pinot Noir'

4. Ergebnisse

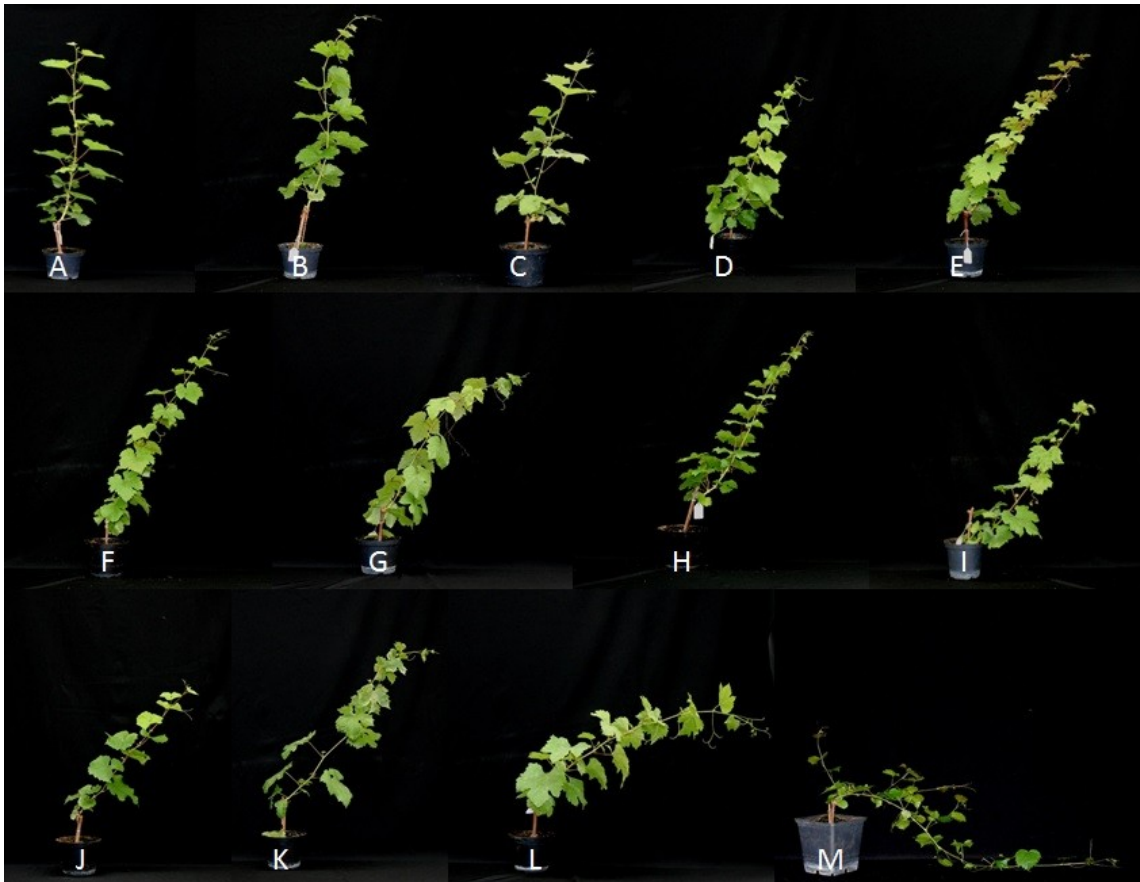


Abbildung 9: Bonitur der Weinrebenreferenzsorten im Jahr 2018 bei einer Sprosslänge von 50-60 cm, A= 'Monastrell', B= 'Merzling', C= 'Augster', D= 'Garnacha Tinta', E= 'Cabernet Sauvignon', F= 'Sauvignon Blanc', G= 'Muscat Ottonel', H= 'Regent', I= 'Vermentino', J= 'Barbera Nera', K= 'Dattier de Beyrouth', L= 'Aramon Noir', M= 'Couderc 3309'

Weiterhin ist zu erwähnen, dass bei zu geringen Sprosslängen die Pflanzen aller Sorten tendenzmäßig eine aufrechte Triebhaltung einnahmen, wohingegen eine zu große Sprosslänge (>60 cm) aufgrund des Eigengewichts des Sprosses zu einer hängenden Triebhaltung führte.

Ein einheitlicher Boniturtermin der Triebhaltung nach 13 bzw. 15 Wochen (Abbildung A 12-Abbildung A 14) wies zum Teil ebenfalls die erwartete charakteristische Triebhaltung bei den Sorten auf, erzeugte aber aufgrund des unterschiedlich schnellen Sprosswachstums gleicher Sortenvertreter größere Standardabweichungen. Des Weiteren besaßen besonders die waagerechten Sorten ein langsames Sprosswachstum (Abbildung 10 M und N) und wiesen zum Boniturtermin nach 15 Wochen deshalb eine aufrechte bis halb aufrechte Triebhaltung auf. Aus diesem Grund wurde eine individuelle Bonitur bei 50-60 cm Sprosslänge als optimaler Termin festgelegt.

4.1.2 Charakterisierung von triebhaltungsrelevanten Merkmalen

Neben der Erfassung der Triebhaltung nach OIV 006 sollten triebhaltungsrelevante Merkmale am optimalen Boniturtermin eine bessere Charakterisierung der Referenzsorten ermöglichen und eventuelle Zusammenhänge von Merkmalsausprägungen zur Triebhaltung aufdecken (Abbildung 10).

Es konnte bestätigt werden, dass aufrechte Sorten die schmalsten Triebwinkel aufwiesen und die Triebwinkel in Richtung einer hängenden Triebhaltung zunahmen. Besonders die aufrechten Sorten 'Monastrell', 'Merzling' und 'Augster' besaßen sehr schmale und die hängende Sorte 'Couderc 3309' sehr weite Triebwinkel. Da im Vergleich zu den aufrechten Sorten alle weiteren Sorten signifikant größere Winkel aufwiesen, kann somit ein Zusammenhang zwischen Triebwinkel und Triebhaltung bestätigt werden. Die Triebwinkel wurden auf Höhe von 5, 10 und 15 cm des Sprosses gemessen (Abbildung 10 C bis H). Eine Sprosshöhe nach 15 cm erwies sich als optimal, um die Neigung des Triebes am besten zu erfassen. Hierbei zeigten alle Gruppen halb aufrechter, waagerechter, halb hängender und hängender Sorten signifikante Unterschiede zu den aufrechten Sorten. Triebwinkel nach 5 und 10 cm Sprosshöhe zeigten geringere Unterschiede zwischen den Sorten.

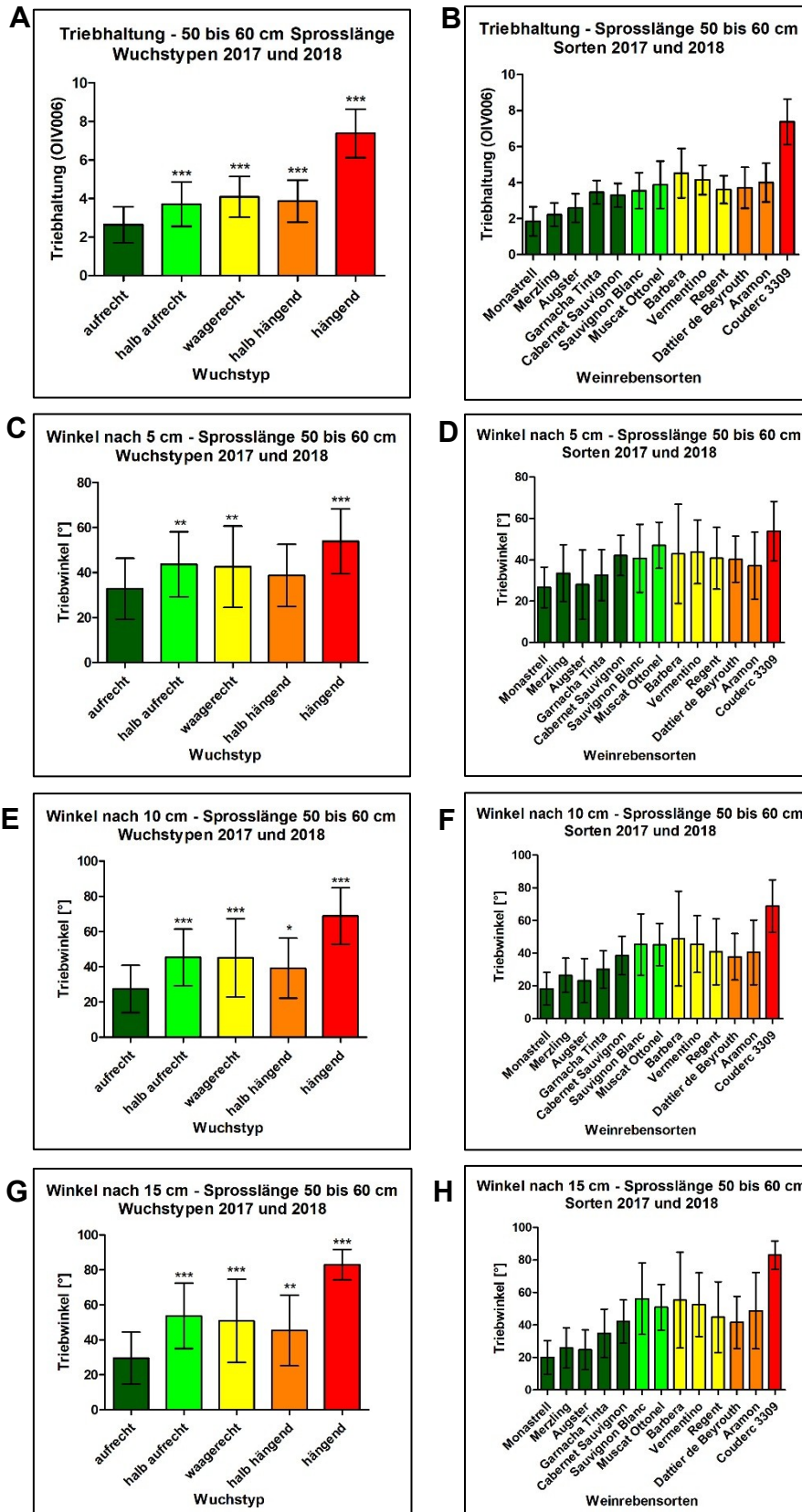
Die Anzahl der Internodien zeigte nur für die halb aufrechten Sorten eine schwach signifikant höhere Anzahl. Alle anderen Sorten zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den aufrechten Sorten. Ein direkter Zusammenhang mit der Triebhaltung scheint somit nicht als wahrscheinlich (Abbildung 10 I und J). Für das Merkmal der durchschnittlichen Länge der Internodien verhält es sich wegen keiner feststellbaren signifikanten Unterschiede ähnlich (Abbildung 10 O und P).

Für den Sprossdurchmesser zeigten die halb aufrechten, waagerechten und hängenden Sorten signifikant schmalere Sprossdurchmesser im Vergleich zu den aufrechten Sorten. Ein Zusammenhang zwischen einem größeren Sprossdurchmesser und einer aufrechten Triebhaltung ist somit gegeben (Abbildung 10 K und L). Die Messung der Gesamtlänge des Hauptsprosses zu einem einheitlichen Termin ergab für die halb aufrechten Sorten durchschnittlich ein signifikant stärkeres Längenwachstum, wohingegen die waagerechten Sorten ein signifikant verringertes Sprosswachstum aufwiesen (Abbildung 10 M und N).

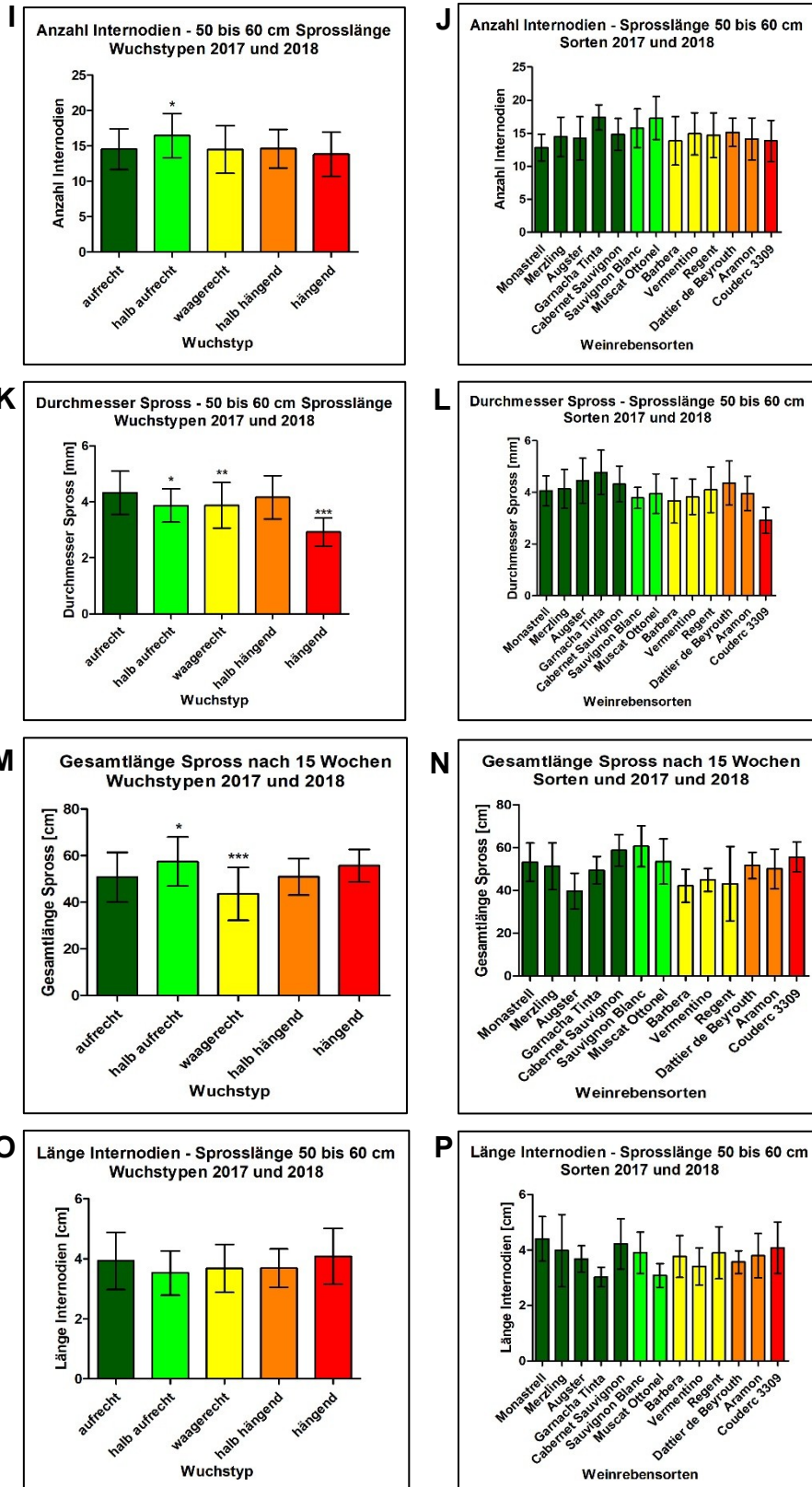
Die Anzahl der Verzweigungen und somit der Seitensprosse war besonders für die hängende Sorte 'Couderc 3309' signifikant stark erhöht (Abbildung 10 Q und R). Diese Sorte zeigte in vielen Merkmalen und ihrer gesamten Morphologie einen

4. Ergebnisse

deutlichen Unterschied zu allen weiteren Sorten. Alle Vertreter der Sorte 'Regent' zeigten generell keine Seitensprosse. Eine Zusammenfassung aller bonitierten Merkmale innerhalb eines Spinnennetzdiagramms (Abbildung 11) hebt alle Unterschiede hervor.



4. Ergebnisse



4. Ergebnisse

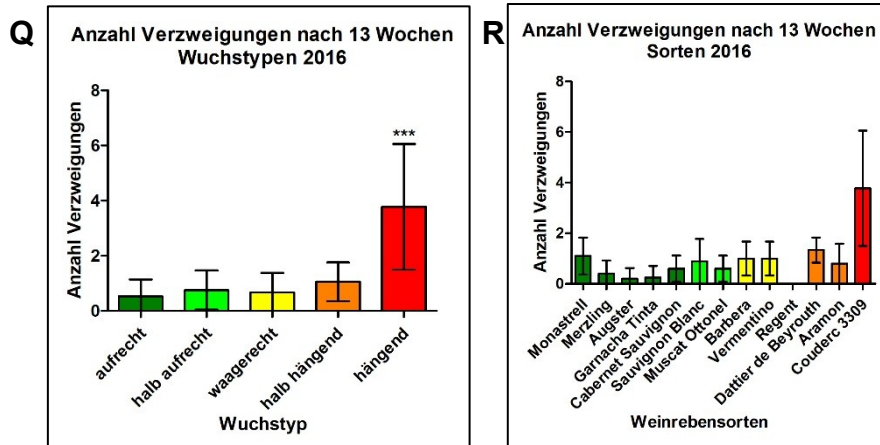


Abbildung 10: Bonitur der Merkmale Triebhaltung, Triebwinkel nach 5, 10 sowie 15 cm Sprosslänge, Anzahl Internodien, Länge Internodien, Anzahl Verzweigungen, Sprossdurchmesser und Gesamtlänge Hauptspross in den Jahren 2017 und 2018, A= Triebhaltung Wuchstyp, B= Triebhaltung Sorten, C= Triebwinkel nach 5 cm (Wuchstyp), D= Triebwinkel nach 5 cm (Sorten), E= Triebwinkel nach 10 cm (Wuchstyp), F= Triebwinkel nach 10 cm (Sorten), G= Triebwinkel nach 15 cm (Wuchstyp), H= Triebwinkel nach 15 cm (Sorten), I= Anzahl Internodien (Wuchstyp), J= Anzahl Internodien (Sorten), K= Sprossdurchmesser (Wuchstyp), L= Sprossdurchmesser (Sorten), M= Gesamtlänge Spross (Wuchstyp), N= Gesamtlänge Spross (Sorten), O= Länge Internodien (Wuchstyp), P= Länge Internodien (Sorten), Q= Anzahl Verzweigungen (Wuchstyp), R= Anzahl Verzweigungen (Sorten), * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

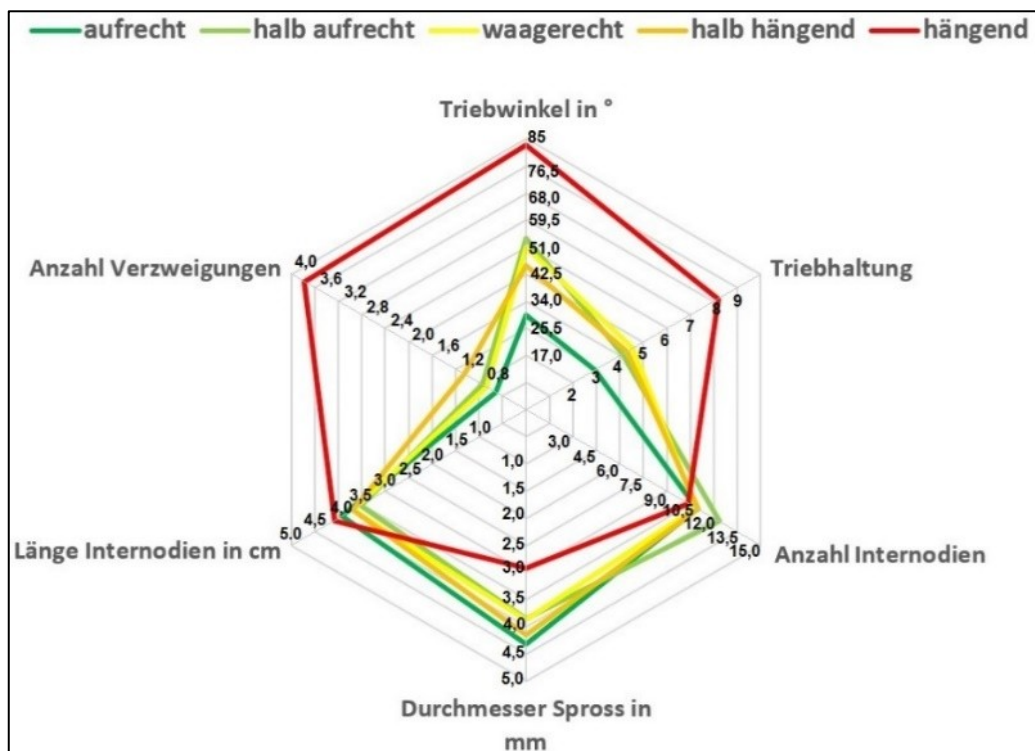


Abbildung 11: Spinnennetzdiagramm für die bonitierten Merkmale im Jahr 2017 und 2018 für die Wuchstypen aufrecht bis hängend

Alle Merkmale wurden auch zusammen an einem einheitlichen Boniturtermin betrachtet (Abbildung A 15), worauf jedoch nicht weiter eingegangen werden soll, da dieser Termin als nicht optimal gewertet wurde.

4.1.3 Vergleich des Sprosswachstums über mehrere Boniturtermine

Da sich die Sprosslänge als ein wichtiger Einflussfaktor für den Boniturtermin und die Triebhaltung herausstellte, wurde bei den Referenzsorten das Sprosswachstum an vier Terminen (13.-16. Woche), zwischen welchen jeweils eine Woche lag (Abbildung 12), bonitiert.

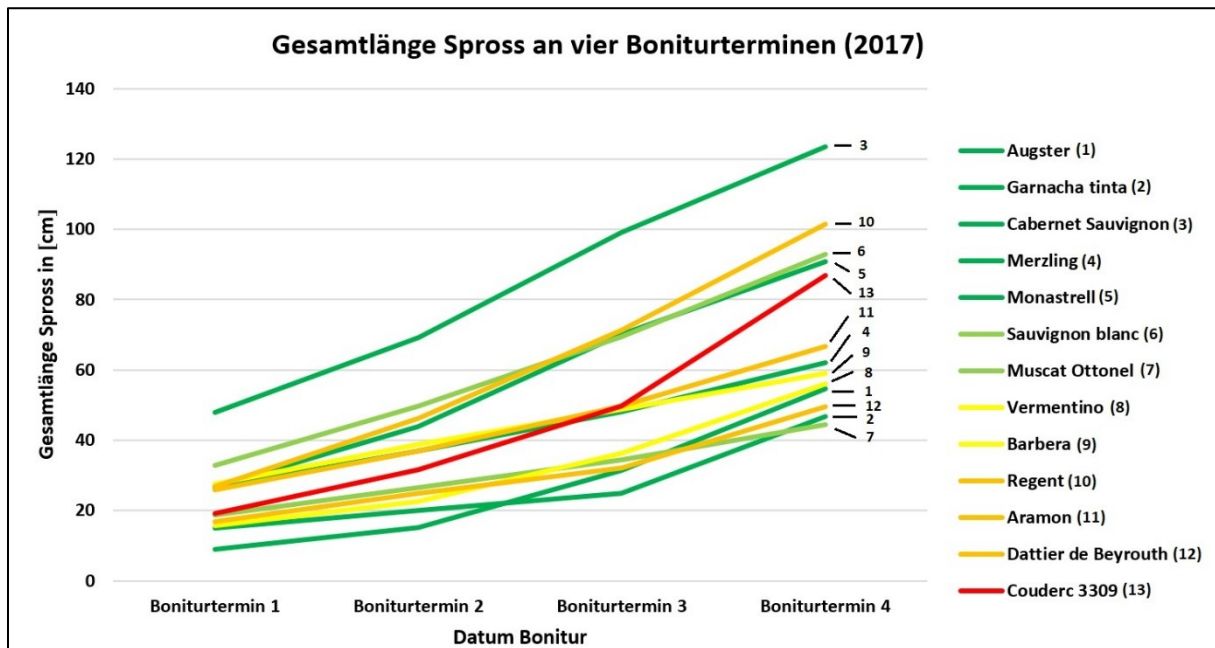


Abbildung 12: Zeitlicher Verlauf des Längenwachstums des Hauptsprosses bei den Referenzsorten im Jahr 2017

Es zeigte sich, dass die Sorte 'Cabernet Sauvignon' sehr schnellwüchsig war. Hierauf folgten 'Regent', 'Sauvignon Blanc', 'Monastrell' und 'Couderc 3309'. Am langsamsten wuchsen im Untersuchungsjahr 2017 die Sorten 'Dattier de Beyrouth', 'Garnacha Tinta' und 'Muscat Ottonel'. Tendenziell beschleunigte sich das Sprosswachstum mit der Zeit. Ein Zusammenhang der Geschwindigkeit des Wachstums und der Triebhaltung nach OIV 006 wurde nicht ersichtlich. So zählten z.B. die aufrechten Sorten 'Cabernet Sauvignon' und 'Monastrell' zu den schnell wüchsigen und 'Augster' sowie 'Garnacha Tinta' zu den langsam wüchsigen Sorten.

4.1.4 Zusammenhang Triebhaltung und Triebwinkel

Um zu ermitteln, ob eine Korrelation zwischen der Triebhaltung nach OIV 006 und dem Triebwinkel besteht, wurde den erhobenen Boniturdaten der Triebhaltungen 1, 2, 3, 4, 5 und 6-9 die entsprechenden Triebwinkel zugeordnet. Für die nun

4. Ergebnisse

gruppierten Triebwinkel wurde der Mittelwert und die Standardabweichungen ermittelt. Die oberen und unteren Grenzen der Standardabweichungen wurden als Punkte in einem Koordinatensystem definiert. Durch diese konnte eine lineare Regressionsgerade mit zugehöriger Formel gelegt werden (Abbildung 13).

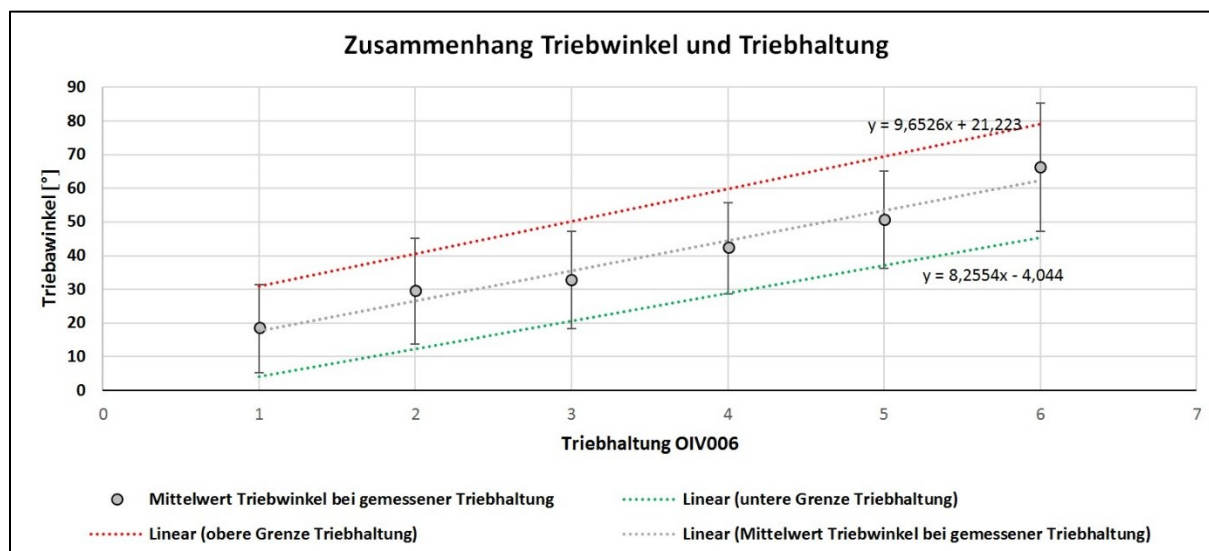


Abbildung 13: Aus der Bonitur abgeleiteter Zusammenhang zwischen Triebwinkel und Triebhaltung

In die Formeln der Regressionsgeraden konnten Werte von Triebhaltung bzw. Triebwinkel eingesetzt werden. Ergebnis ist die Spannbreite der zu erwartenden Triebwinkel bei bonitierter Triebhaltung bzw. Triebhaltung bei bonitierten Triebwinkel (Tabelle 11). Diese Formeln gelten für den Boniturtermin bei einer Sprosslänge von 50-60 cm sowie unter Gewächshausbedingungen und basieren auf den Boniturdaten der untersuchten 13 Referenzsorten aus den Jahren 2017-2018.

Tabelle 11: Zusammenhang zwischen Triebhaltung und Triebwinkel

bonitierte Triebhaltung	Triebwinkel [°] untere Grenze	Triebwinkel [°] obere Grenze	bonitierter Triebwinkel [°]	Triebhaltung untere Grenze	Triebhaltung obere Grenze
1	4	12	10	1,0	1,7
2	12	41	20	1,0	2,9
3	21	50	30	1,1	4,1
4	29	60	40	2,0	5,3
5	37	69	50	3,0	6,5
6	45	79	60	4,0	7,7
7	54	89	70	5,0	8,9
8	62	98	80	5,9	9,0
9	70	108	90	6,9	9,0

4.1.5 Wahrnehmung Gravitation bei den Referenzsorten

Das beschriebene Aufhängen der Referenzsorten zeigte, dass alle Pflanzen die Fähigkeit besaßen, ihr Sprosswachstum entlang des Gravitationsvektors auszurichten (Abbildung 14). Eine Einflussnahme des Phototropismus auf diese Ausrichtung ist auszuschließen, da die einzige Lichtquelle unterhalb der Pflanzen installiert war. Eine Störung des Gravitropismus bei den Referenzsorten ist somit nicht zu erkennen.



Abbildung 14: Wahrnehmung der Gravitation bei der Weinrebe, A= 'Monastrell', B= 'Merzling', C= 'Augster', D= 'Garnacha Tinta', E= 'Cabernet Sauvignon', F= 'Sauvignon Blanc', G= 'Muscat Ottonel', H= 'Regent', I= 'Vermentino', J= 'Barbera', K= 'Dattier de Beyrouth', L= 'Aramon', M= 'Couderc 3309'

4.2 Analyse genomischer Sequenzen bei der Weinrebe

4.2.1 Genomische Sequenzanalyse von *VviLAZY1*

Bei den Sequenzanalysen von *VviLAZY1* in den 13 Referenzsorten (jeweils acht unabhängige Sequenzierungen) wurde für jede Sorte außer bei 'Cabernet Sauvignon' und 'Couderc 3309' das Vorliegen von zwei Allelen gezeigt. Die Identifizierung von ausschließlich einem Allel könnte auf Homozygotie schließen lassen. Die allgemeine Exon-Intron-Struktur von *VviLAZY1* zeigt die Existenz von fünf Exons und vier Introns (Abbildung A 20), von der sich eine AS-Abfolge von 381 AS ableiten lässt.

4. Ergebnisse

Eine Übersicht identifizierter Unterschiede im Vergleich zu *VviLAZY1* (GSVIVG01010528001) des Referenzgenoms von 'PN40024' gibt Tabelle 12. Die grafische Darstellung der Unterschiede in Bezug auf ihre Position liegt im Anhang vor (Abbildung A 21 bis Abbildung A 23).

Tabelle 12: Mutationen auf DNA- und AS-Ebene bei den 13 Referenzsorten für das Kandidatengen *VviLAZY1* basierend auf genomischen Sequenzanalysen

Sorte	Wuchstyp	Allel	Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'		
			Mutationen in Introns	Mutationen in Exons	Veränderungen AS-Sequenz
'Augster'	aufrecht	1	2 SNPs	1 SNP	-
		2	1 SNP	-	-
'Cabernet Sauvignon'	aufrecht	1	17 SNPs	3 SNPs	-
		2			
'Garnacha Tinta'	aufrecht	1	16 SNPs, 2 Insertionen	1 SNP	-
		2	-	1 SNP	-
'Monastrell'	aufrecht	1	2 SNPs	-	-
		2	1 SNP	-	-
'Merzling'	aufrecht	1	43 SNPs, 6 Deletionen, 1 Insertion	7 SNPs	D69E, T173I
		2	1 SNP	-	-
'Sauvignon Blanc'	halb aufrecht	1	16 SNPs	3 SNPs	-
		2	2 SNPs	-	-
'Muscat Ottonel'	halb aufrecht	1	15 SNPs	3 SNPs	-
		2	1 SNP	-	-
'Barbera Nera'	waagerecht	1	1 SNP	-	-
		2	15 SNPs	3 SNPs	-
'Vermantino'	waagerecht	1	1 SNP	-	-
		2	2 SNPs	-	-
'Regent'	waagerecht	1	1 SNP	-	-
		2	43 SNPs, 6 Deletionen, 1 Insertion	7 SNPs	D69E, T173I
'Dattier de Beyrouth'	halb hängend	1	16 SNPs, 2 Insertionen	1 SNP	-
		2	2 SNPs	1 SNP	-
'Aramon Noir'	halb hängend	1	16 SNPs, 2 Insertionen	1 SNP	-
		2	1 SNP, 1 Insertion	-	-
'Couderc 3309'	hängend	1	42 SNPs, 6 Deletionen, 1 Insertion	7 SNPs	D69E
		2			

Es konnten Unterschiede (SNPs, Deletionen, Insertionen) an insgesamt 79 Positionen festgestellt werden, welche vorwiegend in Intron 3 und 4 lagen. Hierbei hatten Insertionen eine Größe von 1-21 bp und Deletionen von 1-19 bp. Mutationen direkt im Spleißbereich wurden nicht gefunden. Unterschiede im Exonbereich konnten ausschließlich bei 'Merzling', 'Regent' und 'Couderc 3309' beobachtet werden und führten zu den Aminosäureaustauschen D69E und T173I. Hervorzuheben ist, dass 'Merzling' und 'Regent' heterozygot und 'Couderc 3309'

homozygot in Bezug auf die identifizierten AS-Austausche vorlagen. D69E ist hierbei als konservativer Austausch anzusehen, T173I als nicht konservativer.

VviLAZY1 gehört aufgrund der IGT-Abfolge in Domäne II zur Familie der IGT-Proteine und besitzt somit fünf konservierte Domänen (Dardick et al. 2013). Die identifizierten AS-Austausche lagen außerhalb dieser Domänen (Abbildung 15).

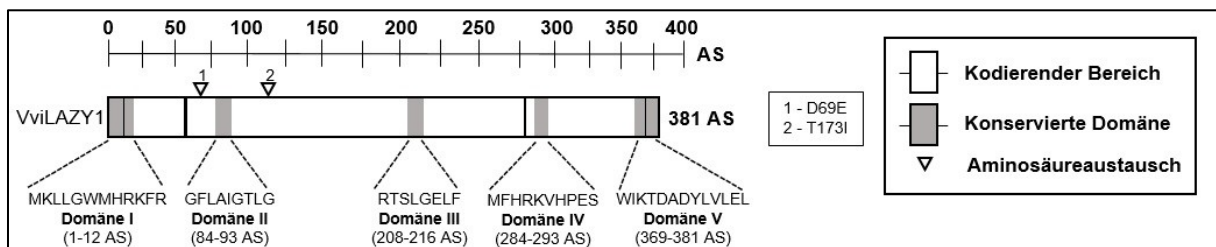


Abbildung 15: Auswirkungen der Mutationen auf die Aminosäureabfolge bei VviLAZY1 in den Referenzsorten im Vergleich zu 'PN40024'

4.2.2 Genomische Sequenzanalyse von VviTAC1

Für VviTAC1 wurde außer bei 'Muscat Ottonel' bei den Referenzsorten das Vorliegen von jeweils zwei Allelen bestätigt. Bei 'Augster', 'Vermentino' und 'Sauvignon Blanc' wurde jeweils ein potentiell drittes Allel sequenziert. Dieses jeweilige dritte Allel wurde nicht über unabhängige Sequenzanalysen bestätigt und stellte auf Sequenzebene stets eine Kombination aus den anderen zwei Allelen dar. Dies lässt die Ausbildung von Chimären bzw. Artefakten während der PCR vermuten (Haas et al. 2011).

Die allgemeine Exon-Intron-Struktur von VviTAC1 (Abbildung A 16) zeigt wie für VviLAZY1 die Existenz von fünf Exons und vier Introns, von der sich eine AS-Abfolge von 291 AS ableiten lässt. Identifizierte Unterschiede im Vergleich zu VviTAC1 (GSVIVG01027402001) des Referenzgenoms 'PN40024' sind in Tabelle 13 dargestellt. Die grafische Darstellung der Unterschiede in Bezug auf ihre Position liegt im Anhang vor (Abbildung A 17 bis Abbildung A 19).

4. Ergebnisse

Tabelle 13: Mutationen auf DNA- und AS-Ebene bei den 13 Referenzsorten für das Kandidatengen *VviTAC1*

Sorte	Wuchstyp	Allel	Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'		
			Mutationen in Introns	Mutationen in Exons	Veränderungen AS-Sequenz
'Augster'	aufrecht	1	-	-	-
		2	3 SNP's, 2 Deletionen, 1 Insertion	1 SNP	L103V
'Cabernet Sauvignon'	aufrecht	1	-	-	-
		2	37 SNP's, 4 Deletionen, 4 Insertionen	3 SNP's	L103V, P207L
'Garnacha Tinta'	aufrecht	1	8 SNP's, 2 Deletionen, 1 Insertion	3 SNP's	L103V, P207L
		2	16 SNP's, 5 Deletionen, 1 Insertion	3 SNP's	L103V, P207L
'Monastrell'	aufrecht	1	43 SNP's, 3 Deletionen, 3 Insertionen	4 SNP's	L103V, R189K, P207L
		2	22 SNP's, 2 Deletionen, 2 Insertionen	7 SNP's	L103V, R149P, R189K, D193N, P207L, T289N
'Merzling'	aufrecht	1	1 Deletion	-	-
		2	-	-	-
'Muscat Ottonel'	halb aufrecht	1	17 SNP's, 3 Deletionen, 3 Insertionen	3 SNP's	L103V, P207L
		2	-	-	-
'Sauvignon Blanc'	halb aufrecht	1	1 Deletion	-	-
		2	22 SNP's, 4 Deletionen, 2 Insertionen	6 SNP's	L103V, R149P, R189K, D193N, P207L
'Barbera Nera'	waagerecht	1	42 SNP's, 3 Deletionen, 5 Insertionen	4 SNP's	L103V, R189K, P207L
		2	48 SNP's, 2 Deletionen, 4 Insertionen	4 SNP's	L103V, R189K, P207L
'Vermentino'	waagerecht	1	43 SNP's, 4 Deletionen, 3 Insertionen	4 SNP's	L103V, R189K, P207L
		2	20 SNP's, 3 Deletionen, 3 Insertionen	3 SNP's	L103V, P207L
'Regent'	hängend	1	1 Deletion	-	-
		2	1 Deletion, 1 SNP	-	-
'Dattier de Beyrouth'	halb hängend	1	1 Deletion	-	-
		2	-	-	-
'Aramon Noir'	halb hängend	1	1 SNP, 1 Insertion	-	-
		2	23 SNP's, 2 Deletionen, 2 Insertionen	7 SNP's	L103V, R149P, R189K, D193N, P207L, T289N
'Couderc 3309'	hängend	1	29 SNP's, 6 Deletionen, 5 Insertionen	11 SNP's	L103V, P146R, R149P, R189K, D193N, P207L, Q259R
		2	29 SNP's, 6 Deletionen, 3 Insertionen	13 SNP's	A85T, L103V, P146R, R149P, R189K, D193N, P207L, P229L, Q259R

Es wurden an insgesamt 126 Positionen Unterschiede im Vergleich zu *VviTAC1* (GSVIVG01027402001) von 'PN40024' identifiziert. Diese waren hauptsächlich in den Introns 3 und 4 sowie in Bezug auf den kodierenden Bereich in Exon 3 lokalisiert. Insertionen besaßen eine Größe von 1-20 bp und Deletionen von 1-3 bp. Auch für *VviTAC1* konnten keine Mutationen direkt an Spleißstellen gefunden werden. Auf Aminosäure-Ebene wurden im Vergleich zum Referenzgenom die zehn AS-Austausche A85T, L103V, P146R, R149P, R189K, D193N, P207L, P229L,

4. Ergebnisse

Q259R und T289N ermittelt. Hierbei können AS-Austausche A85T, L103V, R189K, D193N, Q259R und T289N als konservativ und die AS-Austausche P146R, R149P, P207L und P229L als nicht konservativ bewertet werden. Die Positionen aller AS-Austausche sind in Abbildung 16 gezeigt.

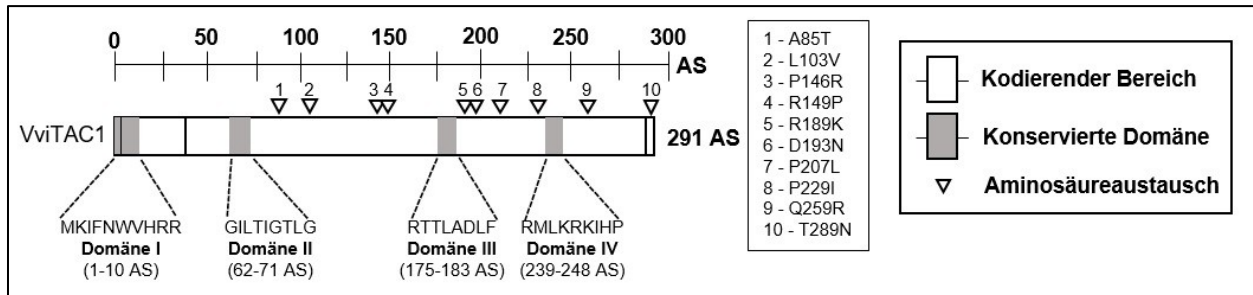


Abbildung 16: Auswirkungen von Mutationen auf die Aminosäureabfolge für die Referenzsorten bei VviTAC1 im Vergleich zu 'PN40024'

Es ist hervorzuheben, dass aufrechte Sorten wie 'Monastrell' als auch halb hängende bzw. hängende Sorten wie 'Aramon Noir' und 'Couderc 3309' zahlreiche AS-Austausche aufwiesen, aber auch aufrechte bzw. halb hängende Sorten wie 'Augster' und 'Dattier de Beyrouth' dem Referenzgenom sehr ähnlich sein konnten. Auswirkungen der identifizierten Mutationen auf das Spleißverhalten für VviTAC1 und VviLAZY1 sollte über Sequenzanalysen und Restriktionsverdaus der cDNA herausgestellt werden. Auswirkungen der AS-Austausche auf die Proteinfunktion wurden über Komplementationsanalysen mit *Arabidopsis thaliana* untersucht.

4.3 Vergleichende Transkriptanalysen zu VviTAC1 und VviLAZY1

4.3.1 Transkriptanalysen von VviTAC1 und VviLAZY1 zum Boniturzeitpunkt I

Transkriptanalysen zum Boniturzeitpunkt I und somit zum Zeitpunkt des Austriebs im Versuchsjahr 2017 ergaben, dass für VviTAC1 und VviLAZY1 bei allen 13 Referenzsorten keine Transkripte nachgewiesen werden konnten. Dies könnte in einer fehlenden Expression oder in der zu geringen Sensitivität des semiquantitativen Transkriptnachweises liegen.

4.3.2 Transkriptanalysen von VviTAC1 und VviLAZY1 bei 12 Referenzsorten im Jahr 2017 zum Boniturzeitpunkt II

Für Boniturzeitpunkt II wurden 12 Sorten mit jeweils 15 Proben (Blatt, Nodium, Internodium) entlang des Sprosses untersucht. Für vergleichbare Transkriptanalysen

4. Ergebnisse

wurde ein Abgleich über die konstitutiv exprimierte *VviGAPDH* durchgeführt. Aufgrund der hohen Anzahl an Proben war es schwierig, diese gänzlich aufeinander abzugleichen, jedoch war es in einem Maße möglich, wie es in Abbildung 17 dargestellt ist, um den Einsatz vergleichbarer cDNA-Mengen sicherzustellen.

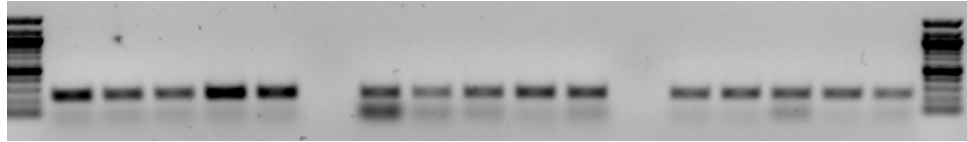


Abbildung 17: Beispielhafter Abgleich von *VviGAPDH* für Internodium, Blatt und Nodium zu Boniturzeitpunkt II, 1-5= Internodium, 6-10= Blatt, 11-15= Internodium

Die Ergebnisse der umfangreichen Transkriptanalysen sind in Abbildung A 24 bis Abbildung A 26 (*VviTAC1*) und Abbildung A 27 bis Abbildung A 29 (*VviLAZY1*) gezeigt. Es wurde eine dreifache PCR-Wiederholung, jedoch keine biologischen Wiederholungen durchgeführt. Unterschiede in Bezug auf die Sorten könnten somit auch in den beprobten Einzelpflanzen begründet liegen.

Allgemein konnte für *VviLAZY1* eine hohe Expression in den Nodien und Internodien, jedoch nur eine sehr schwache bis völlig fehlende Expression in den Blättern festgestellt werden. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Expression von apikal nach basal tendenziell zunahm. Unter genauerer Betrachtung der einzelnen Sorten fiel auf, dass die Expression von *VviLAZY1* unabhängig von der Triebhaltung sehr ausgeprägt, aber auch sehr schwach sein konnte. So zeigte unter anderem die aufrechte Sorte 'Cabernet Sauvignon' eine starke Expression von *VviLAZY1*, wohingegen die aufrechte Sorte 'Merzling' eine im Vergleich sehr niedrige Expression aufwies. Die halb hängenden Sorten 'Dattier de Beyrouth' und 'Couderc 3309' besaßen keine auffällig starke oder niedrige Transkription. Um einen Zusammenhang einer hängenden Triebhaltung mit der Expression von *VviLAZY1* zu postulieren, wäre eine Störung des Gravitropismus und somit eine fehlende Transkription erwartet worden. Für 'Aramon Noir' wurde generell eine sehr schwache Transkription bei Nodien und Internodien detektiert, welches mit einer gestörten Expression von *VviLAZY1* und der halb hängenden Triebhaltung in Zusammenhang gebracht werden könnte. Alle weiteren Sorten zeigten keine Auffälligkeiten.

Wie für *VviLAZY1* zeigt sich bei *VviTAC1* eine starke Transkription in den Internodien und Nodien jedoch eine im Verhältnis schwächere Transkription in den Blättern. Ebenso ist eine Zunahme der Transkription von apikal nach basal zu verzeichnen.

Für einen Zusammenhang schmaler Verzweigungswinkel und einer aufrechten Triebhaltung wäre eine schwache Transkription bei den aufrechten Sorten erwartet worden. Entgegen dieser Erwartung zeigten die aufrechte und halb aufrechte Sorte ‘Cabernet Sauvignon’ und ‘Sauvignon Blanc’ eine starke Transkription und die waagrecht bis hängend wachsenden Sorten ‘Barbera Nera’, ‘Regent’ und ‘Aramon Noir’, für die eine stärkere Transkription erwartet wurde, eine im Verhältnis schwache bis annähernd fehlende Transkription. Alle weiteren Sorten zeigten keine Auffälligkeiten bzw. eine durchschnittliche Transkription von *VviTAC1*.

Die Erwartungshaltung in Hinblick auf die Transkriptionsstärke von *VviTAC1* und *VviLAZY1* wurde bei den Sorten mit ihrem jeweiligen Wuchstyp nicht bestätigt. Es zeigte sich jedoch zwischen den Sorten eine große Variabilität. Diese sollte unter Einbezug weiterer Probennahmen, welche über die gesamte Sprosslänge verteilt lagen, zu einem dritten Boniturzeitpunkt in 2018 untersucht werden. Hierzu wurden die Sorten ‘Monastrell’, ‘Merzling’, ‘Vermentino’, ‘Regent’, ‘Aramon Noir’ und ‘Couderc 3309’, welche in den Untersuchungsjahren eine stets stabile Zuordnung ihrer Triebhaltung nach OIV 006 zuließen, untersucht.

4.3.3 Transkriptanalysen von *VviTAC1* und *VviLAZY1* bei ausgewählten

Referenzsorten zum Boniturzeitpunkt III

Wie für den Boniturzeitpunkt II wurde mit dem Housekeeping-Gen *VviGAPDH* ein Abgleich durchgeführt, um den Einsatz vergleichbarer Mengen cDNA für die Transkriptanalysen vom Boniturzeitpunkt III (2018) zu gewährleisten. Ein beispielhafter Abgleich ist in Abbildung 18 gezeigt. Die Transkriptanalysen für jeden Probenpunkt, welche sich aus einer dreifachen biologischen Wiederholung mit einer jeweiligen Wiederholung der PCR zusammensetzen, sind in Abbildung 19 (*VviTAC1*) und Abbildung 20 (*VviLAZY1*) gezeigt.

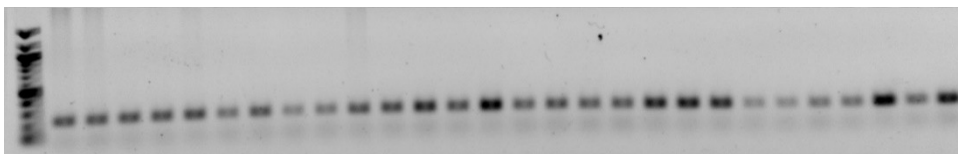


Abbildung 18: Abgleich von *VviGAPDH* für Internodium, Blatt und Nodium zum Boniturzeitpunkt III

Die Transkriptanalysen zeigten für *VviTAC1* im Bereich der Nodien und Internodien für ‘Monastrell’, ‘Merzling’ und ‘Vermentino’ eine im Vergleich der Sorten leicht

erhöhte Transkription, 'Regent' sowie 'Couderc 3309' eine durchschnittliche Transkription und 'Aramon Noir' eine schwache Transkription, wie auch schon zum Boniturzeitpunkt II festgestellt wurde. Die Transkription zeigte im obersten Apikalbereich um Probenpunkt eins, wie in den Transkriptanalysen vom Boniturzeitpunkt II bereits herausgefunden wurde, eine schwache Transkription an. In voranschreitender basaler Richtung des Sprosses, schien die Menge des Transkriptes einen Verlauf von Zu- und Abnahme zu besitzen, welcher in der Ausprägung von zwei Maxima mündete. Das erste Maximum befand sich zumeist bei Probenpunkt zwei bis drei im apikalen Sprossbereich und Maximum zwei in Richtung des basalen Sprossbereiches zwischen Probenpunkt vier bis fünf. In Richtung Probenpunkt sieben schien die Transkriptmenge zumeist erneut zuzunehmen. Die Ausbildung der Maxima war bei den jeweiligen Sorten leicht verschoben. Ein deutlicher Zusammenhang der Ausbildung von Maxima und dem Wuchstyp ergab sich nicht. Es soll darauf hingewiesen werden, dass die siebenmalige Probennahme durchaus den sich über die Gesamtpflanze ändernden Transkriptlevel gut widerspiegelte, es aufgrund der stichprobenartigen Probennahme aber ebenso möglich ist, dass Charakteristika des Verlaufs der Transkriptmengen über den gesamten Spross nicht erfasst wurden.

Die Transkriptanalysen für *VviLAZY1* zeigten besonders für die waagerechten Sorten 'Vermentino' und 'Regent' eine im Vergleich der Sorten überdurchschnittliche starke Transkription (Abbildung 20). Die Ausprägung der Transkription aller weiteren Sorten war nicht auffällig erhöht oder niedrig. Wie für *VviTAC1* war für *VviLAZY1* im Apikalbereich nur eine schwache Transkription zu detektieren. In basaler Richtung des Sprosses ergab sich wiederum die Ausbildung eines Maximums, welches sich für den Nodien- und Internodienbereich bei allen Sorten bei Probenpunkt drei bis vier befand. In basaler Richtung folgend nahm die Transkriptmenge hierauf folgend tendenziell wieder ab. So zeigten jedoch 'Merzling' und 'Couderc 3309' auch die Ausbildung eines zweiten schwachen Maximums um Probenpunkt fünf des Internodienbereiches. Besonders die Sorten 'Vermentino' und 'Regent' wiesen im basalen Bereich um Probenpunkt sechs bis sieben nach einer vorweggegangenen Abnahme des Transkriptes eine erneute deutliche Zunahme der Transkription und somit der Ausbildung eines zweiten Maximums auf. Alle weiteren Sorten zeigten keine erneute Zunahme der Transkription.

4. Ergebnisse

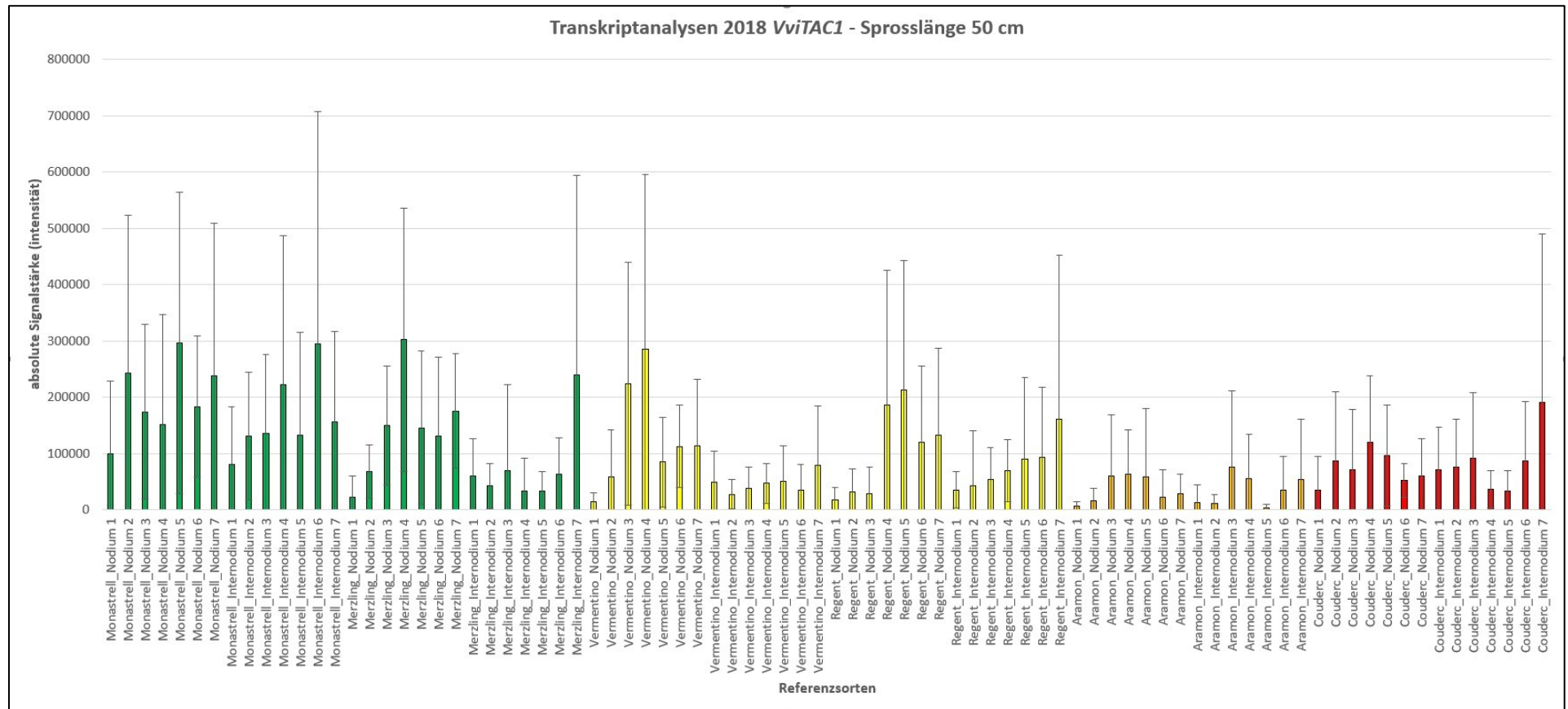


Abbildung 19: Transkriptanalysen für *VviTAC1* bei sechs ausgewählten Referenzsorten im Jahr 2018 für das Pflanzenorgan Nodium bei einer Sprosslänge von 50 cm, grün = aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

4. Ergebnisse

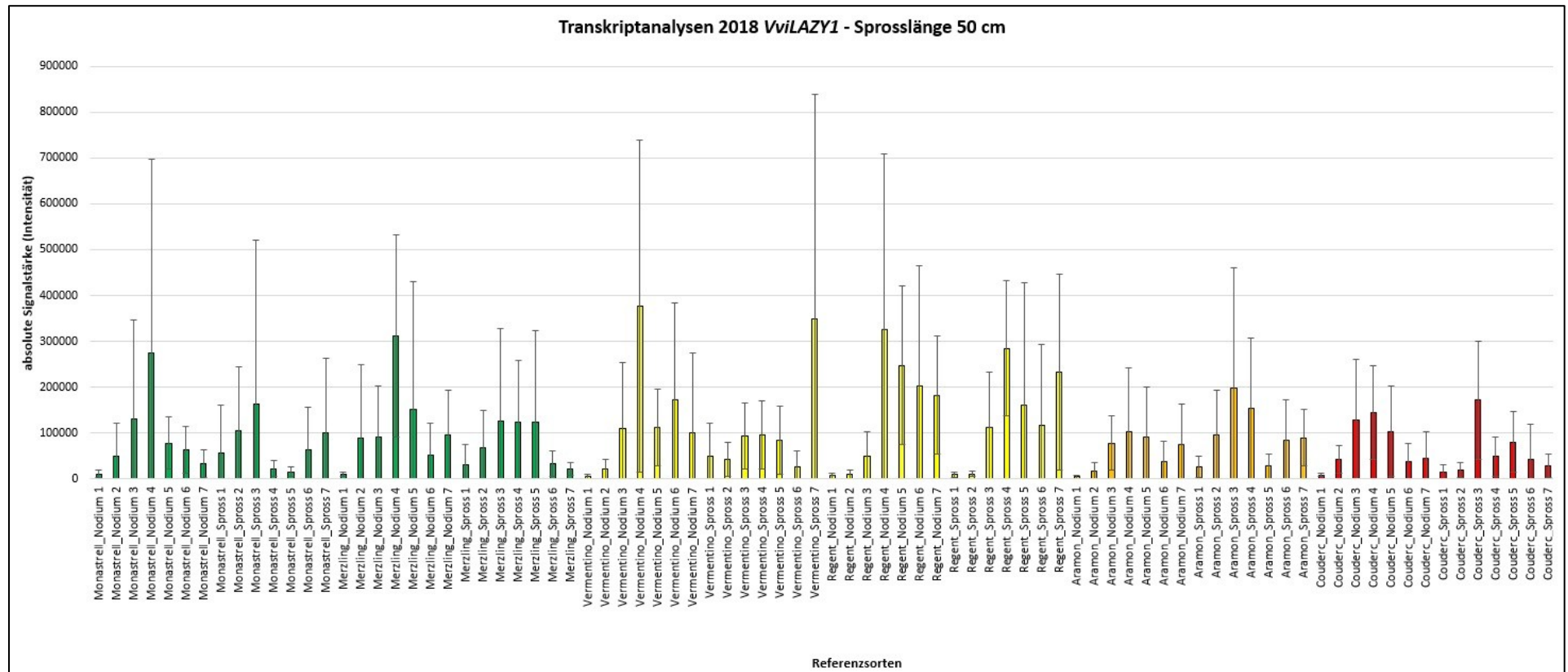


Abbildung 20: Transkriptanalysen für *VviLAZY1* bei sechs ausgewählten Referenzsorten im Jahr 2018 für das Pflanzenorgan Nodium bei einer Sprosslänge von 50 cm, grün = aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

4.4 Untersuchungen zur cDNA von *VviTAC1* und *VviLAZY1*

4.4.1 Sequenzvergleiche auf cDNA-Ebene von *VviTAC1* und *VviLAZY1*

Sequenzanalysen auf cDNA-Ebene wurden für alle 13 Referenzsorten in 2017 und 2018 durchgeführt. Für *VviTAC1* (GSVIVG01027402001) bzw. *VviLAZY1* (GSVIVG01010528001) wurden bei Betrachtung des Bereiches von Start- bis Stoppcodon Sequenzen von 876 bp bzw. 1146 bp erwartet. Es wurden keine Fragmente detektiert, die auf ein alternatives Spleißen hätten hindeuten können. Überraschender Weise wurden jedoch bei den Sequenzierungen in 2017 zunächst Unterschiede zwischen genomischer DNA und cDNA-Ebene festgestellt. Diese sind in Tabelle 14 festgehalten.

Tabelle 14: Unterschiede zwischen Sequenzen auf genomischer Ebene und cDNA-Ebene

Sorte	Gen	Unterschiede zwischen der Nukleotidsequenz von gDNA und cDNA	Unterschiede zwischen der AS-Sequenz von gDNA und cDNA
'Garnacha Tinta' - Allel 1 u. 2	<i>VviTAC1</i>	C620T, A795T	L207P
'Monastrell' - Allel 1	<i>VviTAC1</i>	A866C	- - -
'Muscat Ottonel' - Allel 1	<i>VviTAC1</i>	G78C, Triplet 271-273 fehlend, G331A, A347T, G446C, G566A, G577A, C580T, G788A, T795A	E91 fehlend, E111K, E116V, R149P, R189K, D193N, P194S, S263N
'Muscat Ottonel' - Allel 2	<i>VviTAC1</i>	G566A, T579C, T795A	R149P, R189K
'Barbera Nera' - Allel 1	<i>VviTAC1</i>	G307C, A566G, C579T, T620C	L103V, R189K, P207L
'Aramon Noir' - Allel 1	<i>VviTAC1</i>	T707G, A866C	L236W, N289T
'Muscat Ottonel' - Allel 1	<i>VviLAZY1</i>	C795T	- - -
'Sauvignon Blanc' - Allel 1	<i>VviLAZY1</i>	A357G	- - -

Die Feststellung solcher Unterschiede hätte auf ein RNA-Editing hindeuten können. Da sich RNA-Editing jedoch zumeist auf der Deaminierung von Cytosin zu Uracil beschränkt (Takenaka et al. 2013) und die festgestellten Unterschiede beispielsweise für 'Muscat Ottonel' sehr zahlreich waren, wurde dies in Frage gestellt. Da die Sequenzanalysen auf genomischer Ebene mit dem zugehörigen Pflanzenmaterial in 2015 durchgeführt wurden und die Analysen auf cDNA-Ebene mit neuem Pflanzenmaterial im darauffolgenden Versuchsjahr, wurde dies als Ursache angesehen. Die Sequenzanalysen wurden somit für die betreffenden Sorten ausgehend von Pflanzenmaterial des Untersuchungsjahres 2018 wiederholt. Auf Grundlage dieser neuen cDNA-Sequenzen wurde festgestellt, dass keine Unterschiede zwischen genomischer DNA und der sich ableitenden Transkripte für

die Kandidatengene existent sind. Bei den beobachteten Unterschieden (Tabelle 14) handelt es sich offensichtlich um Unterschiede bei den Klonen der Sorten.

Des Weiteren wurde für *VviLAZY1* bei der Sorte 'Couderc 3309' auf cDNA-Ebene ein zweites und dem Referenzgenom 'PN40024' entsprechendes Allel festgestellt, wohingegen auf genomischer Ebene nur ein Allel identifiziert wurde.

4.4.2 Verifizierung von Mutationen und Allelen über Restriktionsverdaus

Zur Verifizierung der festgestellten AS-Austausche (Tabelle 12 und Tabelle 13) wurde basierend auf den zugehörigen Nukleotidabschnitten CAPS-Marker (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) für die AS-Austausche A85T, L103V, P146R und R189K für *VviTAC1* sowie D69E für *VviLAZY1* abgeleitet und ausgetestet. Die CAPS-Marker erlaubten zusätzlich eine Unterscheidung zwischen homozygoten und heterozygoten Allelzustand. Die entscheidenden Restriktionsschnittmuster, welche eine Unterscheidung des Allelzustandes erlaubten, sind in Tabelle 15 dargestellt.

Die Ergebnisse nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der Restriktionsverdaus am Beispiel der Referenzsorten sind in Abbildung 21 und Abbildung 22 gezeigt.

Die CAPS-Marker ermöglichten eine zweifelsfreie Bestätigung der festgestellten Unterschiede auf Nukleotidebene und boten die Möglichkeit den homozygoten bzw. heterozygoten Allelzustand bei den jeweiligen Sorten zu beurteilen. Dies bedeutete zeitgleich, dass auf die Anzahl der exprimierten Allele Rückschlüsse gezogen werden konnten. In Zusammenhang mit den Sequenzanalysen auf cDNA-Ebene konnten somit die Expression sämtlicher Allele bestätigt werden, welche dies aufgrund ihrer Unterschiede auf Nukleotidebene erlaubten. Für Allele ohne Nukleotidunterschiede im kodierenden Bereich war diese Möglichkeit nicht gegeben. Für die zweifelsfreie Aussage, dass sämtliche Allele exprimiert wurden, hätte beispielsweise ein entsprechend geplanter Northern-Blot durchgeführt werden müssen.

Konkret konnte bei Verdau der *VviTAC1* Amplifikate mit *RsaI* (Abbildung 21 A) ein heterozygoter Zustand des untersuchten SNP's für 'Couderc 3309' gezeigt werden, während alle anderen untersuchten Sorten homozygot ohne den AS-Austausch vorlagen. Zudem besaß 'Vermentino' auf einem Allel einen SNP an einer Schnittstelle für *RsaI*, sodass heterozygot ein ungeschnittenes Fragment detektiert wurde. Das Schnittmuster für *Hpy166II* bei *VviTAC1* (Abbildung 21 B) zeigte, dass die Sorten 'Garnacha Tinta', 'Muscat Ottonel', 'Vermentino' und 'Couderc 3309' einen homozygoten sowie 'Augster', 'Cabernet Sauvignon', 'Sauvignon Blanc' und 'Aramon

Noir' einen heterozygoten Zustand des Austausches besaßen. Der Restriktionsverdau mit *HinfI* für *VviTAC1* (Abbildung 21 C) ergab, dass ausschließlich für 'Couderc 3309' das Vorhandensein des SNP's im homozygoten Zustand nachgewiesen werden konnte. Alle weiteren Sorten lagen homozygot ohne AS-Austausch vor. Ein weiterer Verdau mit *MseI* für *VviTAC1* (Abbildung 21 D) zeigte, dass 'Couderc 3309' homozygot sowie 'Sauvignon Blanc', 'Vermentino' und 'Aramon Noir' einen heterozygoten Zustand des untersuchten SNP's aufwiesen. Für *VviLAZY1* zeigte der Verdau mit *ApoI* (Abbildung 22) einen heterozygoten Zustand des AS-Austausches D69E für die Sorten 'Couderc 3309', 'Regent' und 'Merzling'.

Tabelle 15: Ableitung von CAPS-Markern für *VviTAC1* und *VviLAZY1* basierend auf identifizierten AS-Austauschen

Gen und Enzym	Untersuchter Aminosäure-Austausch	Erwartetes Bandenmuster			
		PCR-Amplifikat	Aminosäure-Austausch homozygot	Kein Aminosäure-Austausch	Aminosäure-Austausch heterozygot
<i>VviTAC1</i> verdaut mit <i>RsaI</i>	A85T	892 bp	95 bp 260 bp 537 bp	95 bp 797 bp	95 bp 260 bp 537 bp 797 bp
<i>VviTAC1</i> verdaut mit <i>Hpy166II</i>	L103V	892 bp	29 bp 54 bp 138 bp 150 bp 521 bp	29 bp 138 bp 204 bp 521 bp	29 bp 54 bp 138 bp 150 bp 204 bp 521 bp
<i>VviTAC1</i> verdaut mit <i>HinfI</i>	P146R	892 bp	11 bp 34 bp 41 bp 52 bp 67 bp 75 bp 76 bp 80 bp 111 bp 334 bp	11 bp 34 bp 52 bp 67 bp 75 bp 76 bp 80 bp 111 bp 375 bp	11 bp 34 bp 41 bp 52 bp 67 bp 75 bp 76 bp 80 bp 334 bp 375 bp
<i>VviTAC1</i> verdaut mit <i>MseI</i>	R189K	892 bp	12 bp 32 bp 94 bp 144 bp 150 bp 163 bp 571 bp	 163 bp 729 bp	12 bp 32 bp 94 bp 144 bp 158 bp 163 bp 571 bp 729 bp
<i>VviLAZY1</i> verdaut mit <i>ApoI</i>	D69E	1158 bp	211 bp 458 bp 489 bp	 489 bp 669 bp	211 bp 458 bp 489 bp 669 bp

4. Ergebnisse

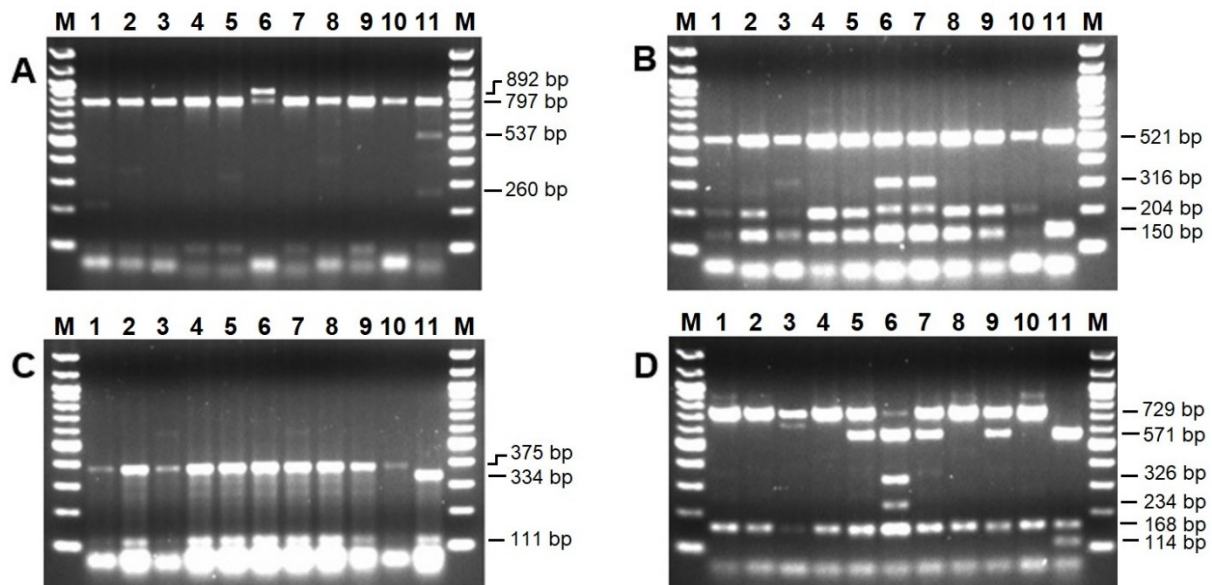


Abbildung 21: Restriktionsverdau für die cDNA von *VviTAC1* zur Überprüfung festgestellter SNP's, die zu AS-Austauschen führen, A= Verdau mit *RsaI*, B= Verdau mit *Hpy166II*, C= Verdau mit *HinfI*, D= Verdau mit *MseI*, E= Verdau mit *ApoI*, 1= 'Augster', 2= 'Cabernet Sauvignon', 3= 'Garnacha Tinta', 4= 'Merzling', 5= 'Sauvignon Blanc', 6= 'Muscat Ottonel', 7= 'Vermantino', 8= 'Dattier de Beyrouth', 9= 'Aramon', 10= 'Regent', 11= 'Couderc 3309'

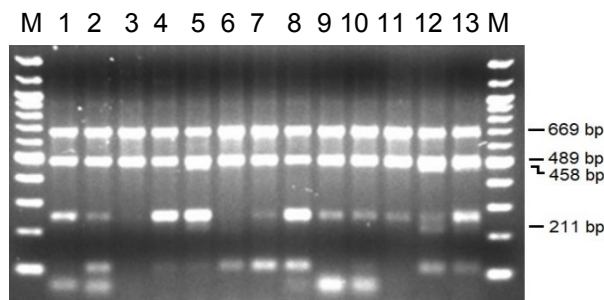


Abbildung 22: Restriktionsverdau für die cDNA von *VviLAZY1* zur Überprüfung festgestellter SNP's, die zu AS-Austauschen führen, 1= 'Augster', 2= 'Monastrell', 3= 'Cabernet Sauvignon', 4= 'Garnacha Tinta', 5= 'Merzling', 6= 'Sauvignon Blanc', 7= 'Muscat Ottonel', 8= 'Vermantino', 9= 'Barbera', 10= 'Dattier de Beyrouth', 11= 'Aramon', 12= 'Regent', 13= 'Couderc 3309'

Die einmaligen Restriktionsschnittmuster lassen erkennen, dass schon durch einfache CAPS-Marker die Unterscheidung von spezifischen Sorten möglich ist.

4.5 Untersuchungen für S1-Populationen von 'Spätburgunder' und 'Trollinger'

4.5.1 Bonitur der Triebhaltung nach OIV 006

Über die Erhebung von Daten der Triebhaltung, Sequenzanalysen von *VviTAC1* und *VviLAZY1* sowie SSR-Analysen mit eng gekoppelten Markern sollte ein möglicher Zusammenhang zwischen Triebhaltung und den Kandidatengenen bei den Sorten von 'Trollinger' und 'Spätburgunder' aufgedeckt werden. Die zusammenfassende Bonitur der Triebhaltung ist in Tabelle 16 und die einer jeden Einzelpflanze in Tabelle

A 4 und Tabelle A 5 gezeigt. Ausgehend von den bonitierten Triebhaltungen wurden Berechnungen für einen Chi-Quadrat-Test durchgeführt (Tabelle 17). Es ergaben sich Spaltungsverhältnisse von 1:3 bzw. 3:1 (aufrecht : standard), welche Hinweise lieferten, dass nur ein Gen verantwortlich für die Merkmalsausprägung der Triebhaltung war.

Tabelle 16: Bonitur der Triebhaltung über drei Jahre bei den S1-Populationen 'Trollinger S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78'

Wuchstyp	Triebhaltung OIV 006	Anzahl Pflanzen 'Trollinger WE 4-7'	Anzahl Pflanzen 'Trollinger S1'	Anzahl Pflanzen 'Spätburgunder FR 52-78'	Anzahl Pflanzen 'Spätburgunder Clevner'
aufrecht	1	0	2	0	13
	3	9	13	11	16
standard	5	8	10	26	9
	7	8	1	1	3

Tabelle 17: Spaltungsanalysen innerhalb der S1-Populationen 'Trollinger S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78'

Sorte	Wuchstyp	Chi-Quadrat-Test Aufspaltung 1:3 (aufrecht:standard) (f=1, p≤0,05)	Chi-Quadrat-Test Aufspaltung 3:1 (aufrecht:standard) (f=1, p≤0,05)
'Trollinger WE 4-7'	standard	0,71	-
'Trollinger S1'	aufrecht	-	1,77
'Spätburgunder FR 52-78'	standard	0,15	-
'Spätburgunder Clevner'	aufrecht	-	0,18

4.5.2 Genomische Sequenzanalysen der S1-Elternpflanzen

Die Ergebnisse der Sequenzanalysen für *VviTAC1* und *VviLAZY1* bei den Sorten von 'Trollinger' und 'Spätburgunder' sind zusammenfassend in Tabelle 18 und Tabelle 19 sowie Abbildung A 30 und Abbildung A 31 dargestellt. Es wurde ersichtlich, dass 'Trollinger WE 4-7' und 'Trollinger S1' auf Sequenzebene für *VviTAC1* und *VviLAZY1* untereinander keine Unterschiede aufwiesen. Insofern sich keine Unterschiede außerhalb des sequenzierten Bereiches befinden, welche einen Einfluss auf die Funktion nehmen könnten, wie z.B. im Promotorbereich, so können die Kandidatengene bei diesen Sorten nicht Auslöser der unterschiedlichen Merkmalsausprägung der Triebhaltung sein.

Für 'Spätburgunder FR 52-78' und 'Spätburgunder Clevner' ließen sich vermehrt Unterschiede nachweisen. Unterschiede zwischen den beiden Sorten bei *VviLAZY1*

4. Ergebnisse

führten nicht zu einer unterschiedlichen AS-Abfolge oder Veränderungen in der Nähe von Spleißstellen. Für *VviTAC1* hingegen ließen sich die AS-Austausche L103V, R189K und P207L identifizieren, welche jedoch außerhalb der bereits beschriebenen konservierten Komplexe lagen.

Tabelle 18: Übersicht der Mutationen bei *VviTAC1* für die S1-Elternpflanzen von ‘Spätburgunder’ und ‘Trollinger’ im Vergleich zum Referenzgenom ‘PN40024’

Sorte	Wuchstyp	Allel	Vergleich zum Referenzgenom ‘PN40024’		
			Mutationen in Introns	Mutationen in Exons	Veränderungen AS-Sequenz
‘Spätburgunder FR 52-78’	standard	1	-	-	-
		2	8 SNP’s, 1 Deletion	3 SNP’s	L103V, P207L
‘Spätburgunder Clevner’	aufrecht	1	35 SNP’s, 5 Insertionen, 2 Deletionen	4 SNP’s	L103V, R189K, P207L
		2	18 SNP’s, 4 Insertionen, 2 Deletionen	3 SNP’s	L103V, P207L
‘Trollinger WE 4-7’	standard	1	36 SNP’s, 5 Insertionen, 2 Deletionen	4 SNP’s	L103V, R189K, P207L
		2	18 SNP’s, 4 Insertionen, 2 Deletionen	3 SNP’s	L103V, P207L
‘Trollinger S1’	aufrecht	1	36 SNP’s, 5 Insertionen, 2 Deletionen	4 SNP’s	L103V, R189K, P207L
		2	18 SNP’s, 4 Insertionen, 2 Deletionen	3 SNP’s	L103V, P207L

Tabelle 19: Übersicht der Mutationen bei *VviLAZY1* für die S1-Elternpflanzen von ‘Spätburgunder’ und ‘Trollinger’ im Vergleich zum Referenzgenom ‘PN40024’

Sorte	Wuchstyp	Allel	Vergleich zum Referenzgenom ‘PN40024’		
			Mutationen in Introns	Mutationen in Exons	Veränderungen AS-Sequenz
‘Spätburgunder FR 52-78’	standard	1	1 SNP	1 SNP	-
		2	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’	aufrecht	1	15 SNPs, 1 Insertion	3 SNPs	-
		2	17 SNPs, 1 Insertion	1 SNP	-
‘Trollinger WE 4-7’	standard	1	16 SNPs, 1 Insertion	3 SNPs	-
		2	18 SNPs, 2 Insertionen	1 SNP	-
‘Trollinger S1’	Aufrecht	1	16 SNPs, 1 Insertion	3 SNPs	-
		2	18 SNPs, 2 Insertionen	1 SNP	-

4.5.3 SSR-Analysen innerhalb der S1-Populationen

Die SSR-Analysen zeigten, dass innerhalb der untersuchten Populationen durch die offene Abblüte von 134 Pflanzen ausschließlich drei Pflanzen keine Selbstung darstellten und für folgende Versuche ausgeschlossen werden mussten (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ergebnisse der SSR-Analysen sind in einer 0-1-Matrix in Tabelle A 4 und Tabelle A 5 zusammengefasst und zeigten das Vorhandensein der unterschiedlichen Allele von *VviTAC1* und *VviLAZY1* der Eltern bei den Nachkommen an.

4.5.4 Korrelation von Triebhaltung und SSR-Analysen

Ableitend aus den erhobenen Boniturdaten und den SSR-Analysen wurden Korrelationsanalysen für das Merkmal der Triebhaltung sowie dem Vorhandensein der identifizierten Allele für die Kandidatengene mittels des Pearson-Tests durchgeführt. Hierbei wurden die Boniturdaten für die Korrelation nach aufrecht (OIV 006 von 1-3) und standard (OIV 006 von 5-7) gruppiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: Korrelation zwischen bonitierter Triebhaltung und SSR-Analysen bei S1-Populationen der Sorten 'Trollinger S1', 'Trollinger We 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' mittels des Pearson-Tests

Sorte und Gen	Pflanzen	Korrelations- koeffizient Allel 1	Korrelations- koeffizient Allel 2	Korrelation Allel 1	Korrelation Allel 2
'Trollinger_S1_TAC1'	24	0,050	-0,196	unbedeutend	unbedeutend
'Trollinger_We 4-7_TAC1'	24	-0,046	-0,299	unbedeutend	schwach negativ
'Spätburgunder Clevner_TAC1'	38	0,294	-0,246	schwach positiv	schwach negativ
'Spätburgunder FR 52-78_TAC1'	30	0,253	-0,327	schwach positiv	schwach negativ
'Trollinger_S1_LAZY1'	25	-0,283	-0,066	schwach negativ	unbedeutend
'Trollinger_We 4-7_LAZY1'	23	0,110	0,051	unbedeutend	unbedeutend
'Spätburgunder Clevner_LAZY1'	36	0,176	-0,596	unbedeutend	mittel negativ
'Spätburgunder FR 52-78_LAZY1'	25	-0,147	0,242	unbedeutend	schwach positiv

Der Korrelationskoeffizient nach Pearson gibt bei einem Wert von 0 bis 0,6 eine schwache bis unbedeutende Korrelation zweier verglichener Merkmale an. Ab einem Wert von 0,8 ist von einer starken bis eindeutigen Korrelation auszugehen. Die Ergebnisse zeigten jedoch in allen Fällen eine schwache und nicht eindeutige Korrelation an. So kann für die untersuchten Sorten von 'Trollinger' und 'Spätburgunder' zunächst von keinem Zusammenhang zwischen den Kandidatengenen *VviTAC1* und *VviLAZY1* und der Ausbildung der Triebhaltung ausgegangen werden.

4.6 Erprobung der Marker an zusätzlichem Pflanzenmaterial der Weinrebe

4.6.1 Austestung CAPS-Markern in S1-Populationen von 'Merzling' und 'Regent'

Die Bonitur der Triebhaltung der S1-Population von 'Merzling' ergab ein Spaltungsverhältnis von 3:1 (aufrecht/halb aufrecht : waagrecht/hängend; $\chi^2=0,21$, $p \leq 0,05$) sowie für Regent von 1:3 (aufrecht/halb aufrecht : waagrecht/hängend; $\chi^2=0,54$, $p \leq 0,05$). Dies spricht dafür, dass ein einzelner Genlocus für die Merkmalsausprägung verantwortlich ist.

4. Ergebnisse

Der Nachweis des D69E- und 'PN40024'-Allels bei *VviLAZY1* ist in Abbildung 23 und Abbildung 24 für die segregierenden S1-Populationen von 'Merzling' und 'Regent' dargestellt. Eine Zusammenfassung der Boniturdaten und des erfassten Allelzustands kann Tabelle 21 und Tabelle 22 entnommen werden.

Aus den erhobenen Daten konnte herausgestellt werden, dass weder das D69E- noch das 'PN40024'-Allel bei *VviLAZY1* in direkten Zusammenhang mit der aufrechten Ausbildung der Triebhaltung stand. Über den Pearson-Test ergaben sich für 'Merzling' Werte von -0,278 ('PN40024'-Allel) und -0,083 (D69E-Allel) sowie für 'Regent' von -0,273 ('PN40024'-Allel) und -0,058 (D69E-Allel), welche dies bestätigten.

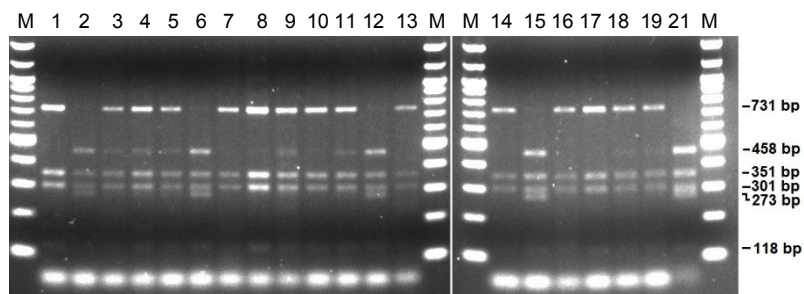


Abbildung 23: Erfassung des 'PN40024'- und D69E-Alles innerhalb einer S1-Population der Sorte 'Merzling' über einen Restriktionsverdau mit *ApoI*, 1-21= Pflanze 1-21, M= 100 bp-Marker

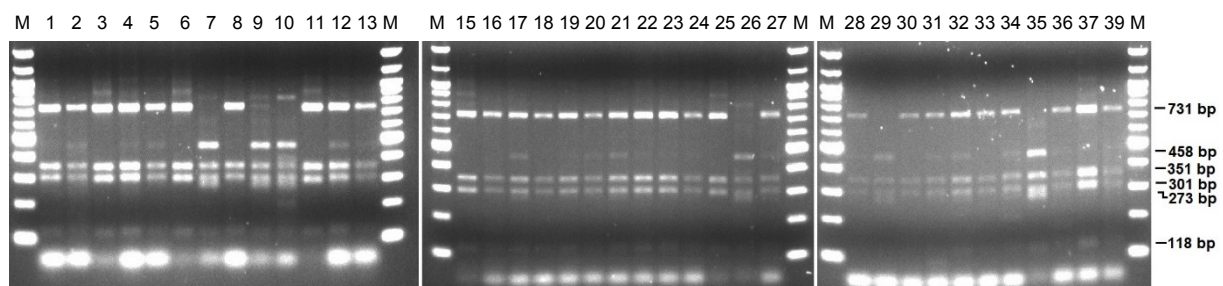


Abbildung 24: Erfassung des 'PN40024'- und D69E-Alles innerhalb einer S1-Population der Sorte 'Regent' über einen Restriktionsverdau mit *ApoI*, 1-39= Pflanze 1-39, M= 100 bp-Marker

4. Ergebnisse

Tabelle 21: Bonitur nach OIV 006 sowie Vorhandensein des 'PN40024'- und D69E-Allels bei der S1-Population 'Merzling'

Sorte und Pflanze	OIV 006	Allel 'PN40024'	Allel D69E	Sorte und Pflanze	OIV 006	Allel 'PN40024'	Allel D69E
'Merzling' - 1	aufrecht	x	-	'Merzling' - 11	aufrecht	x	x
'Merzling' - 2	aufrecht	-	x	'Merzling' - 12	aufrecht	-	x
'Merzling' - 3	aufrecht	x	x	'Merzling' - 13	standard	x	-
'Merzling' - 4	aufrecht	x	x	'Merzling' - 14	aufrecht	x	-
'Merzling' - 5	aufrecht	x	x	'Merzling' - 15	standard	-	x
'Merzling' - 6	aufrecht	-	x	'Merzling' - 16	aufrecht	x	-
'Merzling' - 7	aufrecht	x	-	'Merzling' - 17	standard	x	-
'Merzling' - 8	aufrecht	x	-	'Merzling' - 19	aufrecht	x	x
'Merzling' - 9	aufrecht	x	x	'Merzling' - 21	standard	-	x
'Merzling' - 10	aufrecht	x	-				

Tabelle 22: Bonitur nach OIV 006 sowie Vorhandensein des 'PN40024'- und D69E-Allels bei der S1-Population 'Regent'

Sorte und Pflanze	OIV 006	Allel 'PN40024'	Allel D69E	Sorte und Pflanze	OIV 006	Allel 'PN40024'	Allel D69E
'Regent' - 1	aufrecht	x	-	'Regent' - 21	aufrecht	x	x
'Regent' - 2	standard	x	x	'Regent' - 22	aufrecht	x	-
'Regent' - 3	standard	x	-	'Regent' - 23	aufrecht	x	-
'Regent' - 4	aufrecht	x	-	'Regent' - 24	standard	x	-
'Regent' - 5	standard	x	x	'Regent' - 25	aufrecht	x	x
'Regent' - 6	standard	x	x	'Regent' - 26	standard	-	x
'Regent' - 7	standard	-	x	'Regent' - 27	aufrecht	x	x
'Regent' - 8	aufrecht	x	-	'Regent' - 29	aufrecht	-	x
'Regent' - 9	standard	-	x	'Regent' - 30	standard	x	-
'Regent' - 10	standard	-	x	'Regent' - 31	standard	x	x
'Regent' - 11	aufrecht	x	x	'Regent' - 32	aufrecht	x	x
'Regent' - 12	aufrecht	x	x	'Regent' - 33	standard	x	-
'Regent' - 13	aufrecht	x	x	'Regent' - 35	standard	-	x
'Regent' - 15	standard	x	x	'Regent' - 36	standard	x	x
'Regent' - 17	aufrecht	x	x	'Regent' - 37	standard	x	-
'Regent' - 18	standard	x	-	'Regent' - 39	aufrecht	x	x
'Regent' - 19	standard	x	-				

4.6.2 Austestung von Markern innerhalb eines Weinrebensortiments

Um den Nachweis des D69E-Allels über eine PCR noch leichter zu gestalten, wurde ein Primer für eine 21 bp große Insertion in Intron 4 abgeleitet, welche basierend auf den Sequenzanalysen auf genomischer Ebene ausschließlich im Zusammenhang mit dem D69E-Allel auftrat. Alternativ wurde bei gleichem Reverse-Primer ein alternativer Primer abgeleitet, welcher jeweils 11 bp in 5'- bzw. 3'-Richtung von der Insertion umfasste. So sollte die An- bzw. die Abwesenheit des D69E-Allels bei einem Weinrebensortiment bestehend aus zwanzig Sorten mit aufrechter oder neun Sorten hängender Triebhaltung nachgewiesen werden.

Das Allel mit Insertion wurde für die Sorten 'Couderc 3309' (hängend), 'Merzling' (aufrecht), 'Regent' (waagerecht), 'Felicia' (hängend) und 'Calardis blanc' (aufrecht)

4. Ergebnisse

nachgewiesen (Abbildung 25 A). Außer bei 'Couderc 3309' konnte das Allel ohne Insertion bei allen Sorten nachgewiesen werden (Abbildung 25 B). Diese Ergebnisse sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

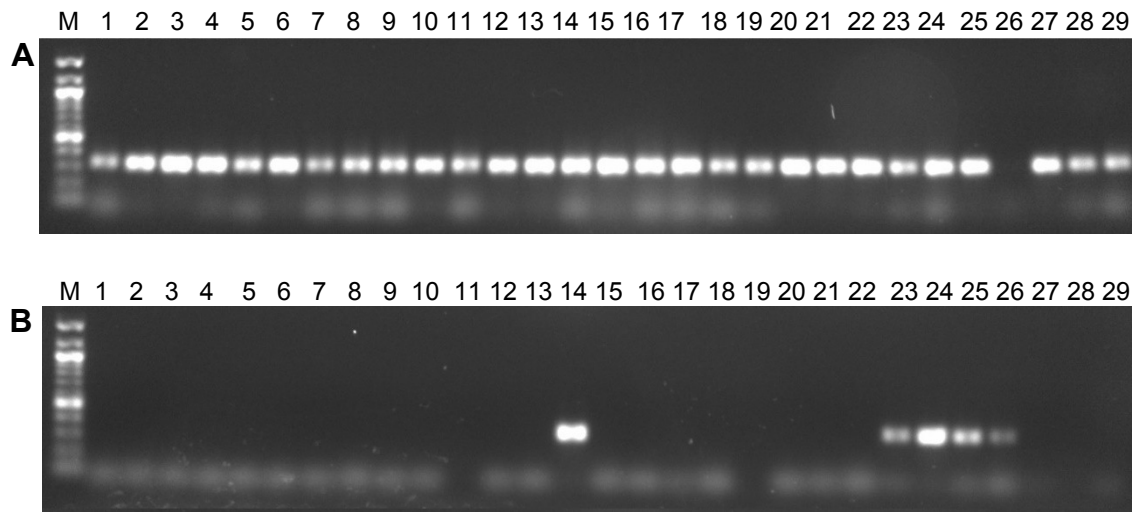


Abbildung 25: Erfassung des 'PN40024'- und D69E-Alles innerhalb eines Weinrebensortiments mittels PCR, A= PCR-Nachweis 'PN40024'-Allel, B= Nachweis der Insertion, 1= 'Apro Feher', 2= 'Hosszunyelue', 3= 'Csmorika', 4= 'Beerheller', 5= 'Plantscher', 6= 'Olber', 7= 'Putzschere', 8= 'Javor Weiss', 9= 'Schwarzelbling', 10= 'Geisenhahn 30/96', 11= 'Hartig 373', 12= 'Blussard Spaet blau', 13= 'Panse Precoce', 14= 'Calardis blanc', 15= 'Augster', 16= 'Garnacha Tinta', 17= 'Cabernet Sauvignon', 18= 'Monastrell', 19= 'Osztrak Feher', 20= 'Hoffman 28/95', 21= 'Möhrenkönig', 22= 'Fraueller', 23= 'Felicia', 24= 'Regent', 25= 'Merzling', 26= 'Couderc 3309', 27= 'Schiele 14/95', 28= 'Chasselas Rouge', 29= 'Dunkelfelder', M= 100 bp-Marker

Tabelle 23: Beurteilung der Triebhaltung sowie Vorhandensein des 'PN40024'- und D69E-Allels innerhalb eines Weinrebensortiments

Rebsorte	OIV 006	Allel 'PN40024'	Allel D69E	Rebsorte	OIV 006	Allel 'PN40024'	Allel D69E
'Apro Feher'	aufrecht	x	-	'Garnacha Tinta'	aufrecht	x	-
'Hosszunyelue'	aufrecht	x	-	'Cabernet Sauvignon'	aufrecht	x	-
'Csmorika'	aufrecht	x	-	'Monastrell'	aufrecht	x	-
'Beerheller'	aufrecht	x	-	'Osztrak Feher'	aufrecht	x	-
'Plantscher'	aufrecht	x	-	'Hoffman 28/95'	hängend	x	-
'Olber'	aufrecht	x	-	'Möhrenkönig'	hängend	x	-
'Putzschere'	aufrecht	x	-	'Fraueller'	hängend	x	-
'Javor Weiss'	aufrecht	x	-	'Felicia'	hängend	x	x
'Schwarzelbling'	aufrecht	x	-	'Regent'	waagerecht	x	x
'Geisenhahn 30/96'	aufrecht	x	-	'Merzling'	aufrecht	x	x
'Hartig 373'	aufrecht	x	-	'Couderc 3309'	hängend	-	x
'Blussard Spaet blau'	aufrecht	x	-	'Schiele 14/95'	hängend	x	-
'Panse Precoce'	aufrecht	x	-	'Chasselas Rouge'	hängend	x	-
'Calardis blanc'	aufrecht	x	x	'Dunkelfelder'	hängend	x	-
'Augster'	aufrecht	x	-				

Die Ergebnisse zeigten zum einen, dass das Allel mit Insertion nicht bei vielen Sorten vertreten war und sowohl bei aufrechten als auch hängenden Sorten vorkam. Die Vermutung eines Zusammenhangs des Allels mit der Triebhaltung ist somit

abzulehnen. Dadurch, dass 'Couderc 3309' kein Allel ohne Insertion besaß, jedoch auf cDNA-Ebene ein heterozygoter Zustand des D69E-Allels nachgewiesen wurde (Abbildung 21), stellte sich heraus, dass die untersuchte Insertion nicht an den D69E-Austausch bei *VviLAZY1* gekoppelt war. Der durchgeführte PCR-Nachweis war somit für den Nachweis des D69E-Allels ungeeignet.

4.7 Komplementationsanalysen für *VviTAC1* und *VviLAZY1* bei *A. thaliana*

4.7.1 Komplementation mit *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukten

Die Transformanten von *attac1*-Mutanten über *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukte bei *Arabidopsis thaliana* konnte erfolgreich durchgeführt werden. Über PCR wurden die Mutation der *attac1*-Mutanten (Abbildung 26 A), der wildtypische Hintergrund Col-0 (Abbildung 26 B) sowie das eingeführte Überexpressionskonstrukt (Abbildung 26 C) nachgewiesen.

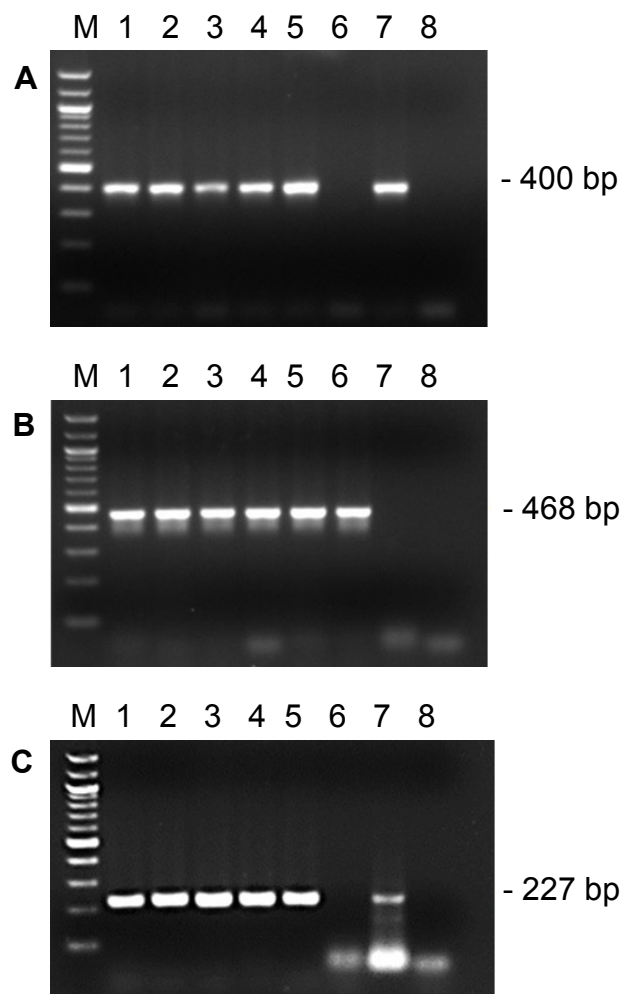


Abbildung 26: Nachweis *attac1*-Mutation, Col-0-Hintergrund und *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukt, A= Nachweis *attac1*-Mutation, B= Nachweis Col-0-Hintergrund, C= Nachweis *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukt, M= 100 bp-Marker, 1-5= *attac1*-Mutanten mit *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukt, 6= Wildtyp Columbia-0, 7= *attac1*-Mutante, 8= Negativkontrolle H₂O

4. Ergebnisse

Die Phänotypisierung von Blattbreite und -länge beim Wildtyp Col-0, *attac1*-Mutante sowie *atlazy1*-Mutante ergab, dass in diesen Merkmalen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Linien bestanden (Abbildung 27 A-C). Die Bonitur der Verzweigungswinkel ergab, dass im Vergleich zum Wildtyp Col-0 bei den *attac1*-Mutanten signifikant kleinere Verzweigungswinkel und bei den *atlazy1*-Mutanten signifikant größere Verzweigungswinkel existierten (Abbildung 27 D).

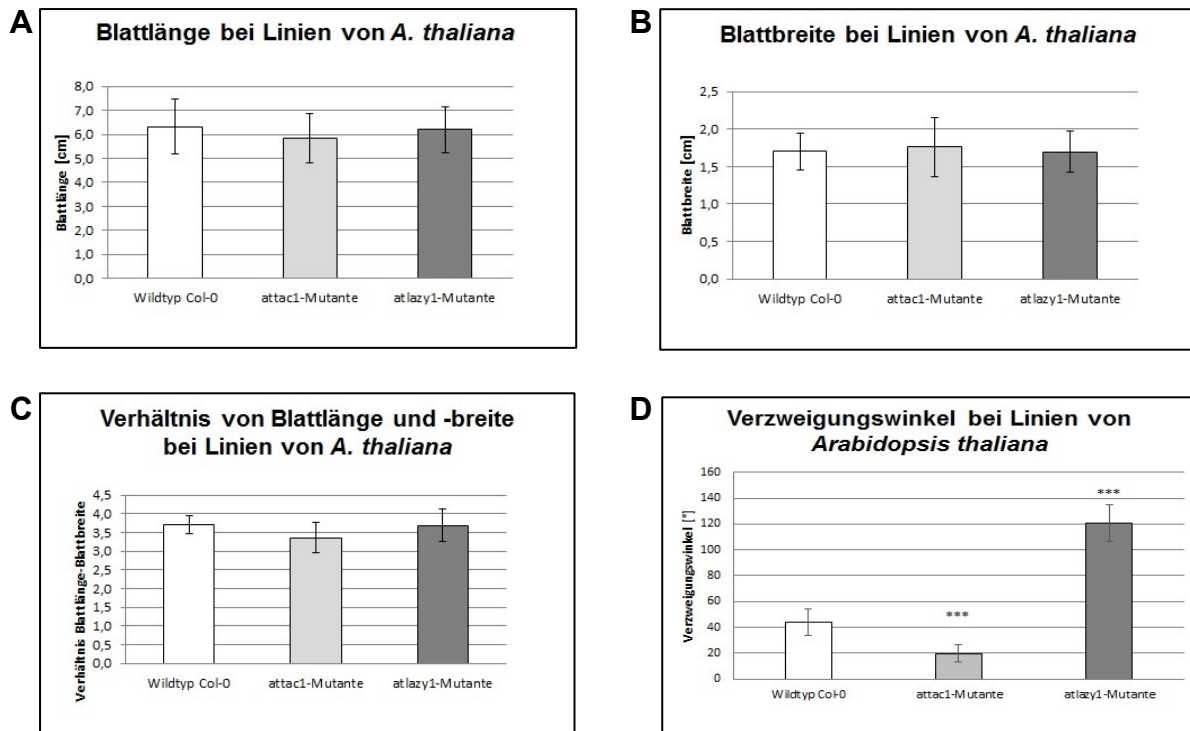


Abbildung 27: Phänotypisierung von Col-0 (Wildtyp), *attac1*-Mutante und *atlazy1*-Mutante über Vermessung von Verzweigungswinkel, Blattbreite und Blattlänge, A= Vermessung von Blattlänge, B= Vermessung von Blattbreite, C= Verhältnis von Blattlänge und -breite, D= Vermessung von Verzweigungswinkel, n= 10, *** p < 0,001 (Ergebnisse entnommen aus Popiolkowski 2018)

Bei einer Komplementation der *attac1*-Mutante mit einem funktionsfähigen *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukt wurde erwartet, dass die Verzweigungswinkel weiter werden und den Winkeln des Wildtyps Columbia-0 entsprechen. Es wurden drei Überexpressionskonstrukte hergestellt. Die Anzahl der erfolgreichen Transformanten ist in Klammern angegeben. Konstrukt 1 (eine Transformante) entsprach auf AS-Ebene dem Referenzgenom 'PN40024', Konstrukt 2 (drei Transformanten) und Konstrukt 3 (zwei Transformanten) deckten sämtliche festgestellten AS-Austausche bei den 13 Referenzsorten ab. Wie in Abbildung 28 dargestellt, bewirkte die Überexpression der *VviTAC1*-Konstrukte in allen Fällen eine Komplementation des Verzweigungswinkels. Die Verzweigungswinkel sind im Vergleich zur *attac1*-Mutante

größer und besitzen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Winkeln des Wildtypen Col-0. Damit kann geschlussfolgert werden, dass die identifizierten AS-Austausche bei *VviTAC1* zu keiner Veränderung der Triebhaltung führen, sondern alle Haplotypen eine vollständige Komplementation erlauben.

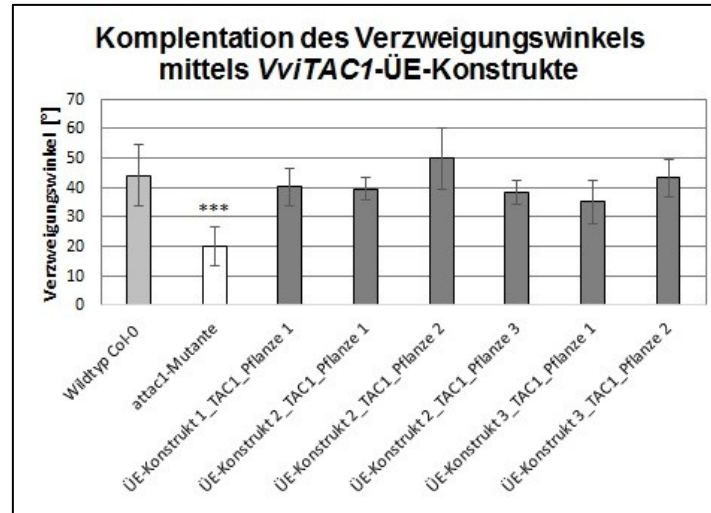


Abbildung 28: Auswirkung auf den Verzweigungswinkel in Komplementationsversuchen mit *attac1*-Mutanten über drei verschiedene *VviTAC1*-Überexpressionskonstrukte, *** $p < 0,001$ (Ergebnisse entnommen aus Popiolkowski 2018)

4.7.2 Komplementation mit *VviLAZY1*-Überexpressionskonstrukten

Trotz mehrmaliger Versuche konnten für *VviLAZY1*-Überexpressionskonstrukte keine transformierten *Arabidopsis*-Pflanzen erhalten werden. Dies könnte unter anderem daran liegen, dass die *atlazy1*-Mutanten eine geringere Anzahl an Blüten und eine geringere Menge an Saatgut im Vergleich zum Wildtyp Col-0 und den *attac1*-Mutanten ausbildeten.

4.8 Motive von *VviTAC1* und *VviLAZY1* sowie Promotorbereich

Ein Vergleich der Konservierung von zu TAC1 und LAZY1 homologen Sequenzen ist in Abbildung 29 und Abbildung 30 dargestellt. Rote Bereiche zeigen hierbei Bereiche mit einem hohen Grad der Konservierung, blaue Bereiche einen niedrigen Grad der Konservierung an. Es wird ersichtlich, dass LAZY1 homologe Sequenzen im Vergleich zueinander allgemein eine sehr hohe Homologie besitzen, welche zudem stärker ausfällt als die TAC1 homologer Sequenzen. Nach Dardick et al. (2013) wurden für TAC1 vier konservierte Domänen beschrieben, welche auch bei LAZY1 vorhanden sind. Für LAZY1 existiert eine zusätzliche fünfte Domäne am C-terminalen Ende, welche ein EAR-Motiv (LxLxL) besitzt.

4. Ergebnisse

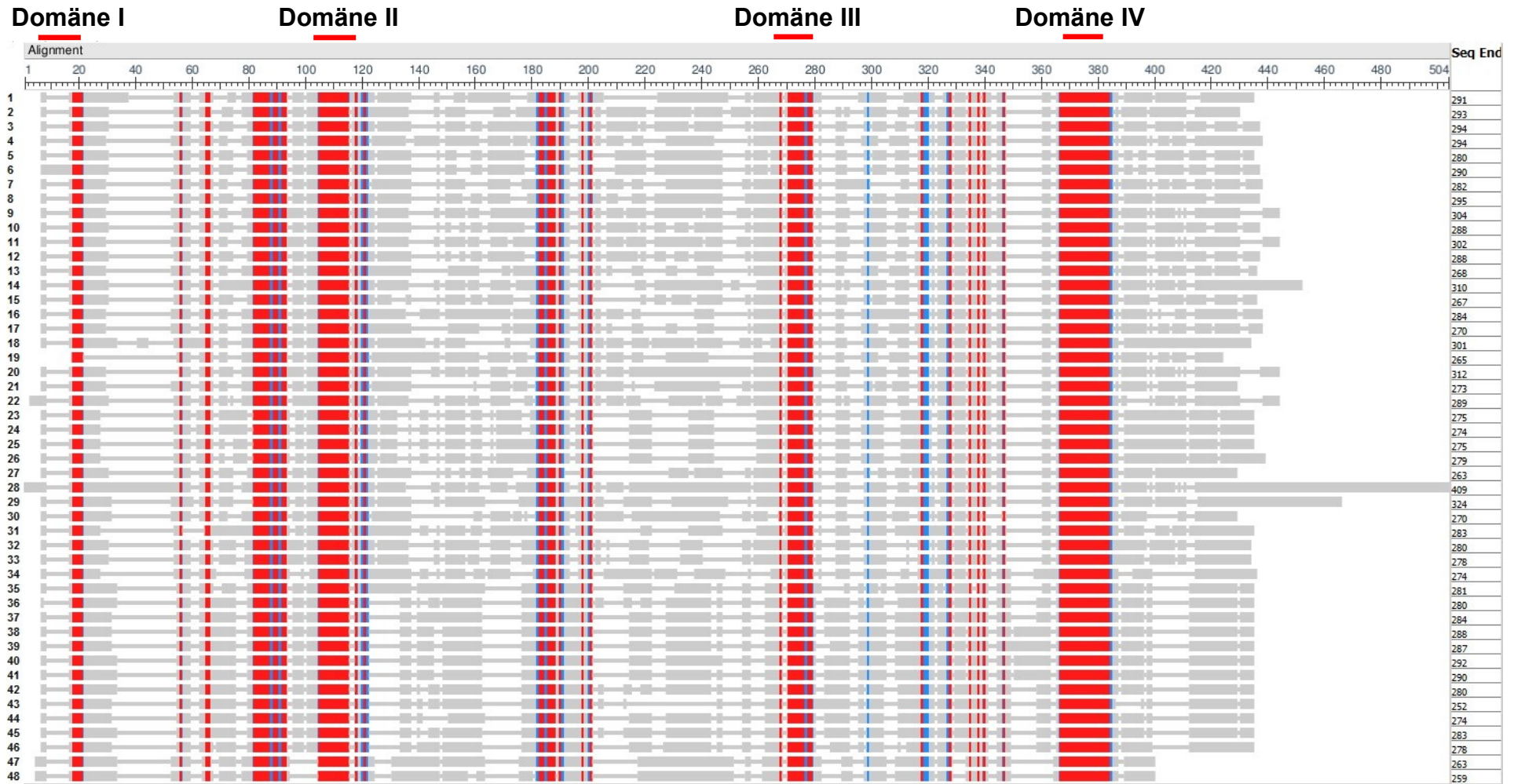


Abbildung 29: Konservierte Regionen in der Proteinstruktur von VviTAC1 bei verschiedenen Pflanzenarten, 1= *Vitis vinifera*, 2= *Ziziphus jujube*, 3= *Theobroma cacao*, 4= *Manihot esculenta*, 5= *Citrus sinensis*, 6= *Citrus clementina*, 7= *Juglans regia*, 8= *Corchorus capsularis*, 9= *Prunus mume*, 10= *Gossypium arboreum*, 11= *Prunus persica*, 12= *Gossypium raimondii*, 13= *Populus trichocarpa*, 14= *Morusnotabilis*, 15= *Cephalotus follicularis*, 16= *Jatropha curcas*, 17= *Populus euphratica*, 18= *Nelumbo nucifera*, 19= *Ricinus communis*, 20= *Pyrus bretschneideri*, 21= *Phaesolus vulgaris*, 22= *Fragaria vesca*, 23= *Nicotiana attenuata*, 24= *Nicotiana sylvestris*, 25= *Nicotiana tabacum*, 26= *Nicotiana tomentosiformis*, 27= *Gossypium hirsutum*, 28= *Malus domestica*, 29= *Eucalyptus grandis*, 30= *Trifolium subterraneum*, 31= *Solanum pennellii*, 32= *Cucumis sativus*, 33= *Cucumis melo*, 34= *Daucus carota*, 35= *Tarenaya hassleriana*, 36= *Capsella rubella*, 37= *Eutrema sasugineum*, 38= *Brassica oleracea*, 39= *Raphanus sativus*, 40= *Brassica rapa*, 41= *Brassica napus*, 42= *Camelina sativa*, 43= *Arabidopsis lyrata*, 44= *Nocacea caerulea*, 45= *Arabidopsis thaliana*, 46= *Arabidopsis alpina*, 47= *Zea mays*, 48= *Oryza sativa*

4. Ergebnisse

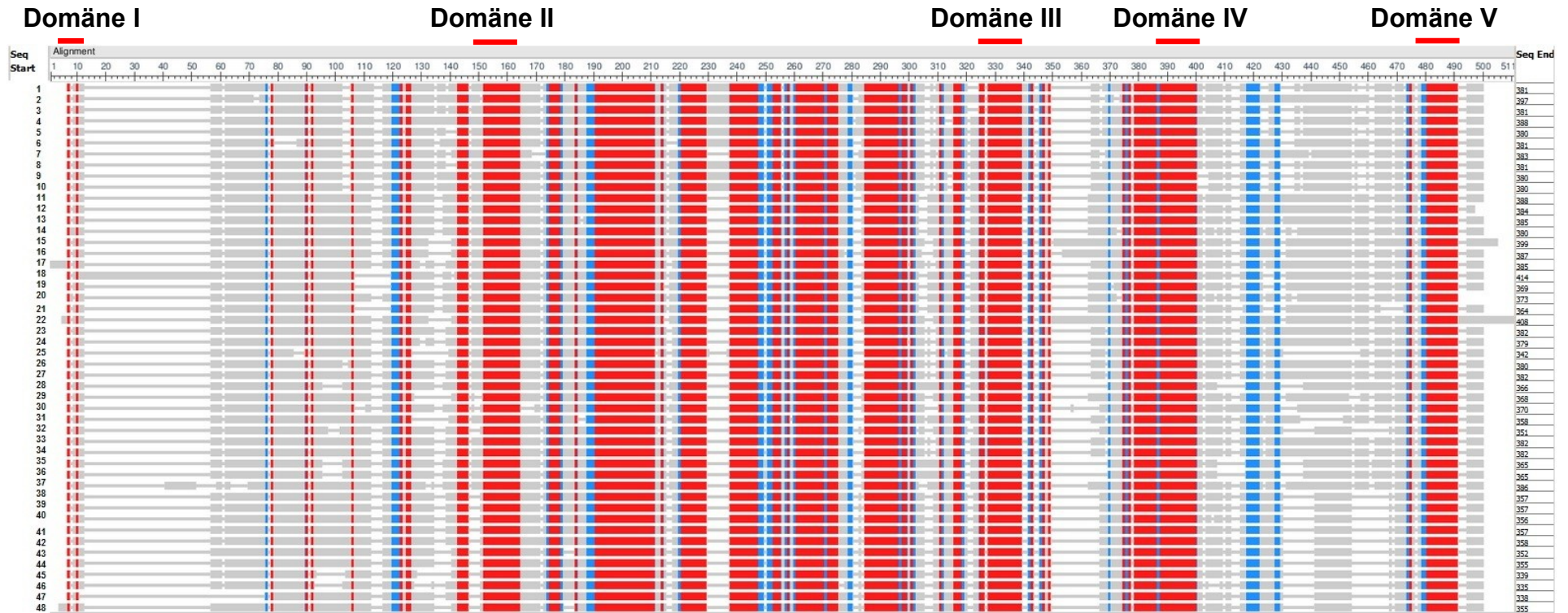


Abbildung 30: Konservierte Regionen in der Proteinstruktur von VviLAZY1 bei verschiedenen Pflanzenarten, 1= *Nicotiana tabacum*, 2= *Fragaria vesca*, 3= *Nicotiana tomentosiformis*, 4= *Capsicum annuum*, 5= *Nicotiana attenuata*, 6= *Ipomoea nil*, 7= *Nelumbo nucifera*, 8= *Nicotiana glauca*, 9= *Solanum pennellii*, 10= *Solanum lycopersicum*, 11= *Corchorus olitorius*, 12= *Corchorus capsularis*, 13= *Theobroma cacao*, 14= *Citrus clementina*, 15= *Morus notabilis*, 16= *Malus domestica*, 17= *Arachis ipanensis*, 18= *Jatropha curcas*, 19= *Manihot esculenta*, 20= *Citrus sinensis*, 21= *Ricinus communis*, 22= *Ziziphus jujuba*, 23= *Glycine max*, 24= *Arachis duranensis*, 25= *Medicago truncatula*, 26= *Phaseolus vulgaris*, 27= *Glycine soja*, 28= *Gossypium raimondii*, 29= *Eucalyptus grandis*, 30= *Cucumis melo*, 31= *Lupinus angustifolius*, 32= *Tarenaya hassleriana*, 33= *Vigna radiata*, 34= *Vigna angularis*, 35= *Gossypium hirsutum*, 36= *Gossypium arboreum*, 37= *Populus euphratica*, 38= *Capsella rubella*, 39= *Eutrema salsugineum*, 40= *Arabidopsis thaliana*, 41= *Camelia sativa*, 42= *Arabidopsis lyrata*, 43= *Brassica oleracea*, 44= *Raphanus sativus*, 45= *Brassica rapa*, 46= *Nocaceae acerulescens*, 47= *Arabidopsis thaliana*, 48= *Brassica napus*

4. Ergebnisse

Die Suche nach NLS-Domänen ergab für VviTAC1 im AS-Bereich von 291-318 die Vorhersage einer solchen Domäne. Der berechnete Score von 5,4 wird mit einer möglichen Lokalisierung im Cytoplasma und Nucleus interpretiert.

Eine potentielle Transmembrandomäne bei VviLAZY1 wurde im AS-Bereich von 78-96 detektiert. Der hierbei berechnete Score lag bei 417, wobei nur Werte >500 als signifikant betrachtet werden.

Bei der Analyse des Promotorbereiches wurden für VviTAC1 verschiedene Elemente im Zusammenhang mit der Regulierung von der Licht-Antwort (elf Elemente), Auxin (vier Elemente), Wasserstress (neun Elemente), der circadianen Rhythmik (ein Element) und Amylase (acht Elemente) sowie bei VviLAZY1 im Zusammenhang mit der Regulierung von der Licht-Antwort (zwölf Elemente), Wasserstress (sechs Elemente), Auxin (zwei Elemente), der circadianen Rhythmik (ein Element) und Amylase (vier Elemente) gefunden. Für beide Gene wurden Promotorelemente für eine gewebespezifische Expression in den Pflanzenteilen, Frucht, Blüte, Embryo- und Endosperm sowie Pollen detektiert. Eine Zusammenfassung sämtlicher Elemente ist in Tabelle A 6 zu finden.

Abschließend wurde das Weinrebengenom auf *TAC1*- und *LAZY1*-ähnliche Sequenzen untersucht. Bei *Arabidopsis thaliana* existieren sechs *LAZY1*-ähnliche Sequenzen, die sich zum Teil über den Besitz der beschriebenen fünf konservierten Domänen auszeichnen (Abbildung 31). Für die Weinrebe wurde in der Phytozome-Datenbank unter GSVIVG01033059001 eine zweite *LAZY*-Sequenz gefunden, welche sich über den Besitz der konservierten Domänen II, III und V auszeichnet und allgemein eine Identität von 47 % besitzt.

4. Ergebnisse

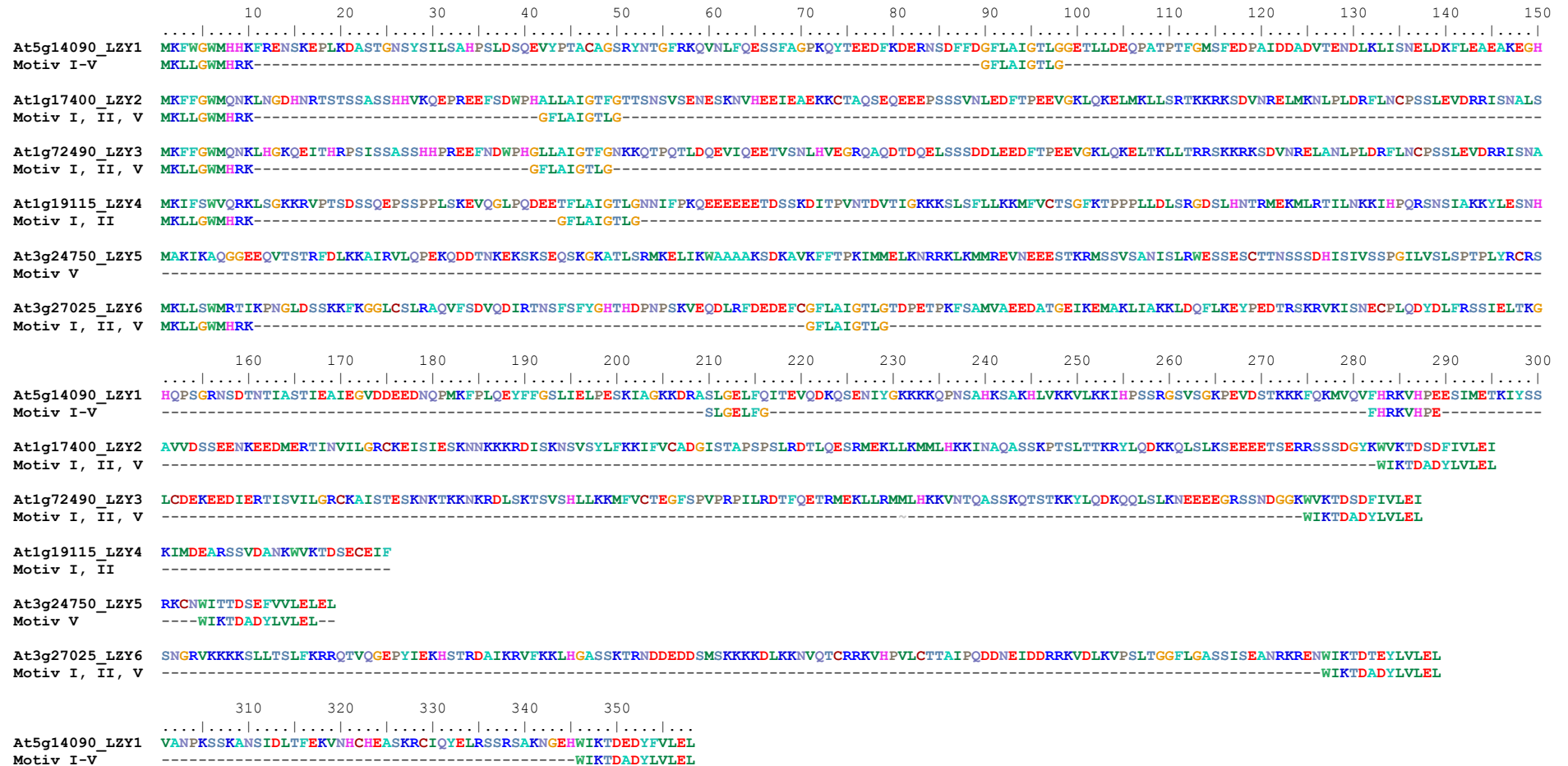


Abbildung 31: Vorhandensein der Komplexe I-V aus der Weinrebe bei LZY1-LZY6 aus *Arabidopsis thaliana* (Taniguchi et al. 2017)

4.9 Proteinstruktur von VviTAC1 und VviLAZY1 nach I-TASSER

Mittels der nach I-TASSER durchgeführten Proteinstrukturanalyse wurden die in Tabelle 24 dargestellten Werte für C-score, TM-score und RMSD für VviTAC1 und VviLAZY1 erhalten. In Abbildung 32 sind die wahrscheinlichsten Proteinstrukturen gezeigt.

Tabelle 24: C-score, TM-score und RMSD-Wert nach einer Vorhersage der Proteinstruktur durch I-TASSER für VviTAC1 und VviLAZY1

Protein	C-score	TM-score	RMSD
VviTAC1 (GSVIVG01027402001)	-4,08	$0,28 \pm 0,09$	$16,3 \pm 3,0 \text{ \AA}$
VviLAZY1 (GSVIVG01010528001)	-2,88	$0,39 \pm 0,13$	$13,7 \pm 4,0 \text{ \AA}$

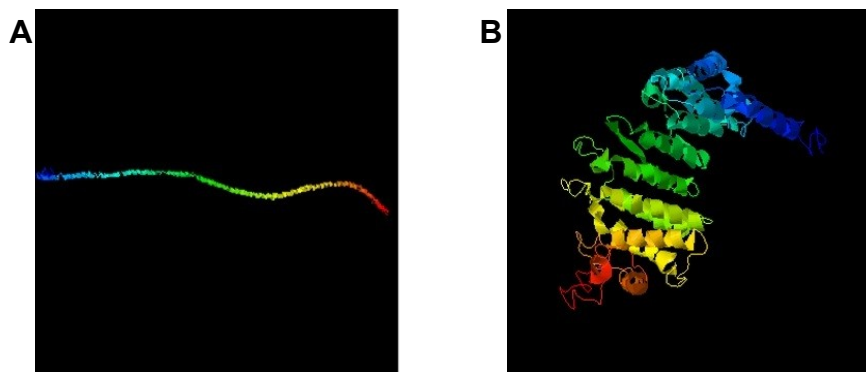


Abbildung 32: Proteinmodell für VviTAC1 und VviLAZY1 nach I-TASSER mit höchstem C-score, A= VviTAC1, B= VviLAZY1

Der C-score umschreibt als Wert wie vertrauenswürdig die vorhergesagte Proteinstruktur ist. Dieser Wert befindet sich in einem festgelegten Bereich von $[-5,2]$. Werte von $>-1,5$ sprechen für eine gute Vorhersage der Struktur, wohingegen für einen Wert von $2,0$ von der Vorhersage einer korrekten Faltung ausgegangen werden kann (Zhang 2008). Für beide Proteine wurde ein niedrigerer C-score als $-1,5$ angezeigt, sodass nicht davon ausgegangen werden kann, dass eine verlässliche Vorhersage der Proteinstruktur erzielt wurde.

Für die Errechnung des TM- und RMSD-Wertes wird das untersuchte Protein mit bereits analysierten Proteinstrukturen verglichen und die topologische Ähnlichkeit wiedergegeben. TM befindet sich in einem Bereich von $[0,1]$. Ein Wert von $<0,2$ zeigt an, dass ein Vergleich nur mit zufälligen und nicht verwandten Proteinen möglich war, wohingegen bei Strukturen mit einem Wert von $>0,5$ von einer gleichen Faltung ausgegangen werden kann. Für einen RMSD-Wert nahe 0 gilt, dass eine große Übereinstimmung zu der vergleichenden Proteinstrukturen vorliegt (Zhang 2008). Der

4. Ergebnisse

TM-score lag jeweils unterhalb von 0,5 und der RMSD-Wert befand sich vom Wert 0 sehr weit entfernt. Diese Werte zeigten, dass in der Datenbank keine vergleichbaren Proteine vorlagen, über welche Rückschlüsse auf die Struktur von VviTAC1 bzw. VviLAZY1 gezogen werden könnten. Dementsprechend konnten auch keine Domänen bzw. Motive mit bekannter Proteinfunktion ausfindig gemacht werden.

4.10 RNA-Silencing von VviTAC1 und VviLAZY1 bei Weinrebe und Tabak

4.10.1 RNA-Silencing mittels GVA-Konstrukte beim Tabak

Es konnten erfolgreich die RNAi-Konstrukte pCambia2301_GVA-VviTAC1, pCambia2301_GVA-VviLAZY1 und pCambia2301_GVA-VviPDS im Agrobakterienstamm GV3101_pSoup hergestellt werden (Abbildung 33). Die angeschlossene Agroinfiltration bei *Nicotiana benthamiana* brachte für alle Konstrukte keine phänotypischen Auffälligkeiten im Vergleich zur Kontrollgruppe mit sich (Ergebnisse nicht dargestellt).

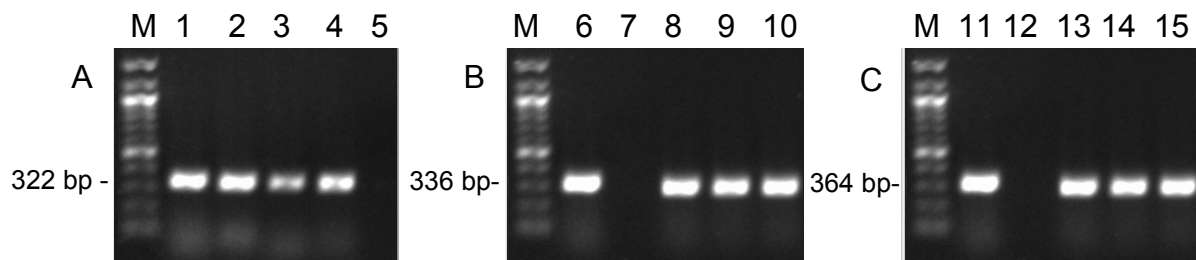


Abbildung 33: Inserttestnachweis für RNAi-Konstrukte von VviTAC1 (A), VviLAZY1 (B) und VviPDS (C) im Vektor GVA, M= 100 bp-Marker, 1-5= Klon VviTAC1-Konstrukt, 6-10= Klon VviLAZY1-Konstrukt, 11-15= VviPDS-Konstrukt

4.10.2 RNA-Silencing mittels GLRaV2-Konstrukte bei der Weinrebe

Es konnten erfolgreich die RNAi-Konstrukte vLR2-VviTAC1 und vLR2-VviLAZY1 im Agrobakterienstamm GV3101_pSoup hergestellt werden (Abbildung 34).

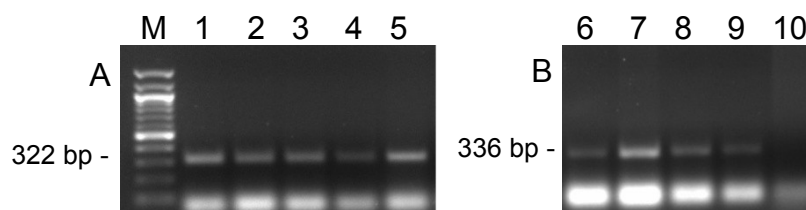


Abbildung 34: Inserttestnachweis für RNAi-Konstrukte von VviTAC1 (A) und VviLAZY1 (B) im Vektor GLRaV-2, 1-5= Klon VviTAC1-Konstrukt, 6-10= Klon VviLAZY1-Konstrukt

4. Ergebnisse

Die bonitierte Triebhaltung und Triebwinkel nach der Agroinfiltration für VIGS der Gene *VviTAC1* und *VviLAZY1* sowie Leerkonstrukten als Kontrolle sind in Abbildung 35 dargestellt.

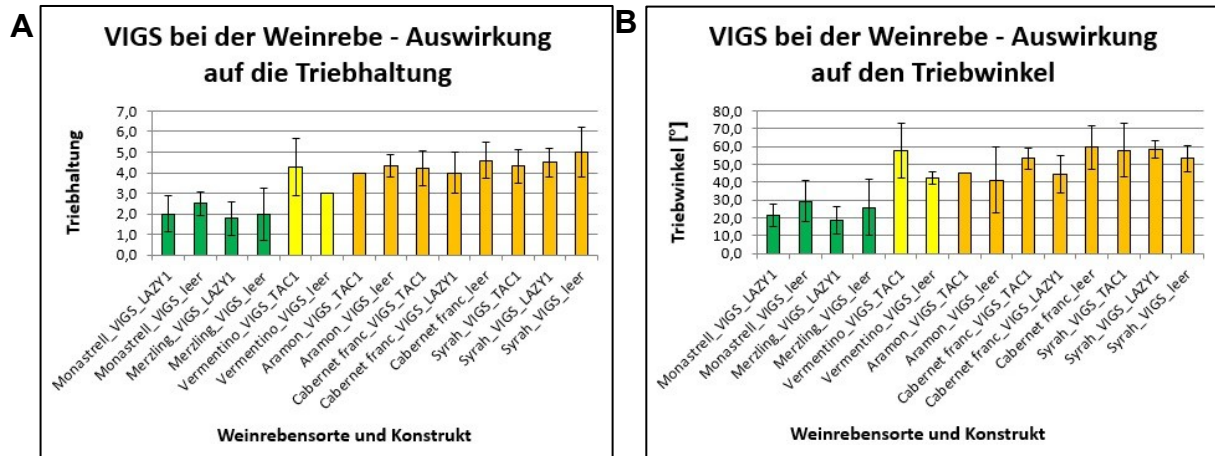


Abbildung 35: VIGS bei der Weinrebe mit den Auswirkungen auf Triebhaltung und Triebwinkel bei einer Sprosslänge von 50 cm, A= Auswirkung von VIGS auf die Triebhaltung, B= Auswirkung auf den Triebwinkel, n=5

Die Bonitur der Triebhaltung und der Triebwinkel bei einer Sprosslänge von 50-60 cm lieferte als Ergebnis keine klaren signifikanten Unterschieden zwischen den VIGS-Pflanzen und ihren Kontrollpflanzen mit Leervektor. Auch bei Betrachtung der Einzelpflanzen fiel keine Pflanze auf, die dem Erwartungsbild eines RNA-Silencing gerecht wurde. Es konnte per PCR nicht nachgewiesen werden, dass Konstrukte in die Pflanzen eingebracht wurden. Es ist somit davon auszugehen, dass die Agroinfiltration nicht erfolgreich war.

5. Diskussion

5.1 Phänotypische Charakterisierung von Weinreben

Bei der Weinrebe steht eine aufrechte Triebhaltung besonders in Zusammenhang mit einer Arbeits- und Kostenersparnis bei der Rebenerziehung (Bauer 2015). Für weiterführende Versuche war es zunächst wichtig, das Pflanzenmaterial eingehend zu phänotypisieren, um Ergebnisse auf molekularer Ebene interpretieren zu können. Zunächst bleibt festzuhalten, dass die untersuchten 13 Referenzsorten ihre erwartete Triebhaltung ausbildeten (Abbildung 10). Besonders 'Augster', 'Merzling', 'Monastrell', 'Vermentino' und 'Couderc 3309' können als sehr verlässliche Referenzsorten für ihre jeweilige Triebhaltung betrachtet werden. Die Sorten 'Dattier de Beyrouth' und 'Aramon Noir' wiesen zumindest die erwartete Tendenz auf, was die Verwendung aller Sorten als Referenzsorten unter Freiland- als auch unter Gewächshausbedingungen rechtfertigte.

Die Bonitur der Triebhaltung nach OIV 006 erfolgte unter Freilandbedingungen zur Blütezeit (<http://www.oiv.int/public/medias/2274/code-2e-edition-finale.pdf>). Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass der Zeitpunkt witterungsabhängig ist und zum Boniturzeitpunkt während der Blüte nach dem OIV-Katalog die Erfassung vieler Merkmale festgeschrieben ist. Dies kann Überschneidungen und eventuelle Probleme im Zeitmanagement nach sich ziehen. Vorteil der eigens durchgeführten Bonitur im Gewächshaus war das Ausbleiben von typischen Krankheits- oder Schädlingsbefall. Somit herrschten kontrollierte Bedingungen vor, welche mit einer minimierten Beeinflussung der Messergebnisse durch externe Faktoren einhergingen.

Für die Bewertung des Boniturschlüssels OIV 006 ist des Weiteren zu hinterfragen, inwiefern das erreichte Längenwachstum einer Rebe am Boniturzeitpunkt während der Blüte bei allen Sorten gleich ist. Da die Triebhaltung auch in einem direkten Zusammenhang mit der Trieblänge steht (alle Sorten mit einer Trieblänge >60 cm prägen eine zunehmend hängende Triebhaltung aus), werden kurz gewachsene blühende Triebe tendenziell eine aufrechtere Triebhaltung als lang gewachsene Triebe aufweisen. Die Vereinheitlichung des Messzeitpunkts der Triebhaltung auf die Trieblänge und nicht den Blütezeitpunkt ist somit vorteilhaft. Dies kann die Findung eines optimalen Zeitpunkts für das Heften der Weinreben unterstützen und den Arbeitsaufwand während der Rebenerziehung minimieren.

Aufgrund der Möglichkeit einer subjektiven Zuordnung der Triebhaltung nach OIV 006 war es ebenso ein wichtiger Gesichtspunkt der vorliegenden Arbeit, diese Subjektivität unter der Zuordnung eines konkreten Messwertes auszuschalten. Dies wurde über die Bonitur des Triebwinkels erreicht (Abbildung 10). Die Bonitur des Triebwinkels in 15 cm Triebhöhe hat sich durch eine leichte Handhabung und schnelle Erfassung bewährt. Der optimale Boniturzeitpunkt für eine Differenzierung war hierfür bei einer Trieblänge von 50-60 cm gegeben.

Da wie erwartet festgestellt wurde, dass ein aufrechter Wuchs mit signifikant schmalen Triebwinkeln in Zusammenhang steht und die Triebwinkel mit zunehmend hängender Triebhaltung größer werden, wurde ein mathematischer Zusammenhang von Triebwinkel und -haltung erstellt (Tabelle 11, Abbildung 13). Hierbei wurde ersichtlich, dass es sowohl Bereiche gibt, die ausschließlich einer einzelnen Triebhaltung zugeordnet werden können, als auch Bereiche existieren, die bei gemessenen Triebwinkel eine Zuordnung zu zwei unterschiedlichen Triebhaltungen erlauben. Diese sich überschneidenden Bereiche stellen eine Ungenauigkeit dar, welche einen vergleichbaren Effekt wie eine subjektive Zuordnung der Triebhaltung haben. Die Messung des Triebwinkels bietet somit keinen Vorteil bei der zweifelsfreien Zuordnung einer Triebhaltung, aber ermöglicht die Erhebung eines objektiven Messwertes.

Eine Bonitur aller Sorten zum selben Zeitpunkt (im Gewächshaus nach 13 bzw. 15 Wochen nach Beginn der Kultivierung) hat sich aufgrund der Ausbildung unterschiedlicher Trieblängen und dem hiermit verbundenen Einfluss auf die Triebhaltung nicht als optimal bewiesen (Abbildung A 15). So wäre z.B. für die aufrechte und schnellwüchsige Sorte 'Cabernet Sauvignon' oder die halb hängende und langsam wachsende Sorte 'Dattier de Beyrouth' die Zuteilung einer abweichenden Triebhaltung aufgrund ihrer unterschiedlichen Wuchsgeschwindigkeit möglich gewesen. Die Wuchsgeschwindigkeit und die Triebhaltung einer Sorte standen bei einer definierten Bonitur nach 50-60 cm Triebwachstum in keinem Zusammenhang (Abbildung 12). So war die aufrechte Sorte 'Cabernet Sauvignon' sehr schnellwüchsig, wohingegen die ebenfalls aufrechte Sorte 'Augster' sehr langsam wuchs.

Die Bonitur weiterer Merkmale (Abbildung 10) ergab, dass die Internodienlänge und Internodienanzahl bei den untersuchten Sorten keinen signifikanten Zusammenhang mit dem Merkmal Triebhaltung aufwiesen. Das Merkmal der Internodienlänge stellt

mit OIV 353 ein im OIV-Katalog getrennt erfasstes Merkmal dar. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die durchschnittliche Internodienlänge von <6 cm bei OIV 353 als sehr klein bezeichnet wird. Die eigens erhobenen Boniturdaten ergaben jedoch bei allen Referenzsorten eine durchschnittliche Internodienlänge von <6 cm. Dies deutet darauf hin, dass die Gewächshausbedingungen und die Anzucht in Töpfen den kultivierten Weinreben eine geringere Wuchskraft erlaubten. Ähnliches lässt sich über die Erfassung des durchschnittlichen Sprossdurchmessers (OIV 354) schlussfolgern, welcher einen Durchmesser von <5 mm als sehr klein bezeichnet. Alle bonitierten Sorten besaßen einen Sprossdurchmesser unterhalb dieses Wertes. Diese Unterschiede der Wuchskraft scheinen jedoch keine veränderte Ausbildung der Triebhaltung bei den jeweiligen Referenzsorten hervorzurufen. Des Weiteren bleibt festzustellen, dass aufrecht wachsende Pflanzen einen signifikant dickeren Sprossdurchmesser besaßen. Dies könnte die Stabilität des Sprosses und einen aufrechten Wuchs unterstützen. Da auch die halb hängenden Sorten einen signifikant dickeren Spross aufwiesen, muss ein allgemeingültiger Zusammenhang von Triebhaltung und Sprossdurchmesser jedoch hinterfragt werden.

Als letzter Punkt bleibt festzustellen, dass sich 'Couderc 3309' in den Merkmalen Triebhaltung, Triebwinkel, Sprossdurchmesser und Anzahl der Seitensprosse stark signifikant von allen übrigen Sorten unterschied. Dies liegt darin begründet, dass diese Sorte aus einer Kreuzung der Arten *Vitis riparia* und *Vitis rupestris* hervorgeht und damit eine andere genetische und phänotypische Konstitution mit sich bringt als die Sorten in der Art *Vitis vinifera*. Im Weinbau dient 'Couderc 3309' als Unterlage, wohingegen alle anderen Referenzsorten direkt in der Weinerzeugung eine Rolle innehaben (Bauer 2015). Aufgrund der anfänglich aufrechten Triebhaltung (bis zu einer Trieblänge von 30 cm) wird vermutet, dass der hängende Wuchs im schmalen Sprossdurchmesser und der allgemein geringen Sprosstabilität begründet liegt.

Für die Optimierung der Bonitur der Triebhaltung bleibt zusammenzufassen, dass unter Gewächshausbedingungen ein optimaler Boniturtermin für die Triebhaltung bei einer Gesamtrieblänge von 50-60 cm in einer Triebhöhe von 15 cm gegeben war. Eine Vereinheitlichung auf den Blütezeitpunkt scheint nicht in jedem Fall optimal und sollte für jede Sorte einzeln betrachtet werden. Des Weiteren ging eine aufrechte Triebhaltung mit schmalen Triebwinkeln einher. Inwiefern ein schmaler Triebwinkel für die Ausbildung einer aufrechten Triebhaltung verantwortlich ist oder ein Triebwinkel ein Nebeneffekt der ausgebildeten Triebhaltung ist, die durch andere

Charakteristika geprägt wird, kann durch die Bonitur nicht erschlossen werden. Dies kann durch molekulare Untersuchungen geklärt werden. Weiterhin unterschieden sich die Wuchskraft unter Gewächshaus- und Freilandbedingungen, weshalb es sich empfiehlt die durchgeführte Phänotypisierung auf dem Feld zu reproduzieren. Da bereits die ersten Merkmale, welche auch im OIV-Katalog vorhanden sind, über Sensortechnik bonitiert werden können (Barré et al. 2019) scheint dies auch für OIV 006 möglich zu sein, um eine möglichst objektive Messung zu gewährleisten.

5.2 Sequenzanalysen für *VviTAC1* und *VviLAZY1*

Im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024' (Jaillon et al. 2007) zeigten die Sequenzanalysen von *VviTAC1* und *VviLAZY1* für alle Sorten außer 'Muscat Ottonel' bei *VviTAC1* sowie 'Cabernet Sauvignon' und 'Couderc 3309' bei *VviLAZY1* einen heterozygoten Zustand. Auf cDNA-Ebene wurde für 'Couderc 3309' jedoch ein zweites Allel identifiziert, das auf genomischer DNA-Ebene nicht erfasst worden war. Trotz einer hohen Anzahl von stets acht unabhängigen Klonen für Sequenzanalysen könnte dies dem Zufall geschuldet sein, sodass nie das potentielle zweite Allel kloniert wurde. Ein weiterer Erklärungsansatz wären zufällige Unterschiede in der Primerbindungssequenz, die eine Amplifizierung des nicht identifizierten Allels unterdrückten.

Für *VviLAZY1* wurden an 79 Positionen (Abbildung A 21-Abbildung A 23) Unterschiede detektiert, welche sich jedoch verstärkt im Intronbereich befanden, ohne hier einen Einfluss auf die Proteinfunktion nehmen zu können. Dies spricht für eine starke Konservierung von *VviLAZY1*. Unterstrichen wird dies dadurch, dass mit D69E und T173I ausschließlich zwei AS-Austausche festgestellt wurden (Tabelle 12). Für *VviLAZY1* traten die meisten der 79 Unterschiede bei den Sorten 'Merzling' (aufrechte Triebhaltung), 'Regent' (waagerechte Triebhaltung) und 'Couderc 3309' (hängender Triebhaltung) auf. Diese drei Sorten mit unterschiedlicher Triebhaltung waren sich somit auf genetischer Ebene für *VviLAZY1* sehr ähnlich. Dies suggeriert, dass die Mehrzahl aller identifizierten Unterschiede für *VviLAZY1* keinen Einfluss auf die Triebhaltung besitzen. Bei Zhang und Yang (2015) wurden des Weiteren Hinweise gefunden, dass Mutationen mit einer Auswirkung auf die Expression die Selektion innerhalb der Evolution eher beeinflussen als Mutationen mit einer Auswirkung auf die Proteinfunktion. Somit weisen Gene mit einer hohen Expression

zumeist eine hohe Konservierung auf. Dies könnte auf eine hohe Expressionsrate und Bedeutung von *VviLAZY1* hindeuten.

Für *VviTAC1* wurden Unterschiede an insgesamt 126 Positionen (Abbildung A 17 bis Abbildung A 19) identifiziert, in Folge dessen bei verschiedenen Sorten bis zu zehn AS-Austausche auftreten konnten (Tabelle 13). Die Konservierung ist daher im Vergleich zu *VviLAZY1* als schwächer zu bezeichnen.

Für *VviTAC1* bzw. *VviLAZY1* existieren nach Dardick et al. (2013) vier bzw. fünf konservierte Domänen, welche auch bei der Weinrebe vorhanden sind (Abbildung 15 und Abbildung 16). Für *Vitis vinifera*, *Prunus persica*, *Fragaria vesca*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* und *Oryza sativa* sind diese Domänen nachfolgend in Tabelle 25 vergleichend dargestellt. Trotz evolutionärer Distanz zwischen diesen Arten zeigen sich in diesen Domänen hohe Konservierungsgrade, was für die Bedeutung dieser Sequenzen für die Genfunktion spricht.

Tabelle 25: Vergleich der Domänen I-V für *TAC1* und *LAZY1* bei verschiedenen Pflanzenarten

Vergleich <i>TAC1</i>	Domäne I	Domäne II	Domäne III	Domäne IV	Domäne V	Identität Protein
<i>Vitis vinifera</i>	MKIFNWVHRR	GILAI GTLGF	TLADLFS	RMLKRKIHP-	-----	100 %
<i>Prunus persica</i>	MKIFNWVKKR	GILTIGTFGF	TLADLFQ	RMLKRKIHP-	-----	48,9 %
<i>Nicotiana tabacum</i>	MKILNWVHRK	GILTIGTFGF	TLADLFS	RVMKRKVHP-	-----	42,3 %
<i>Fragaria vesca</i>	MKILNWVHRK	GILTIGTFGF	TLADLFM	RMLKRKIHP-	-----	41,8 %
<i>Oryza sativa</i>	MKVFNWLRK	GILAI GTLGH	TLADLFA	KMLGKKIHP-	-----	34,6 %
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MKIFNWVHRR	GILAI GTLGF	TLADLFS	RMLKRKIHP-	-----	29,8 %
<i>Brassica napus</i>	MKIFNWVHK	GVTAI GTLGF	TLAEFL	RMLKKKIHP-	-----	29,0 %
<i>Zea mays</i>	MKVFNWLRK	GILAI GTLGH	TLADLFA	KMLGKKIHP-	-----	26,9 %
Vergleich <i>LAZY1</i>	Komplex I	Komplex II	Komplex III	Komplex IV	Komplex V	Identität Protein
<i>Vitis vinifera</i>	MKLLGWMHRK	GFLAI GTLG-	SLGELFQ	--FHRKVHPE	WIKTDADYLVLEL	100 %
<i>Prunus persica</i>	MKLLGWMHRK	GFLAI GTLG-	SLGELFQ	--FHRKVHPE	WIKTDADYLVLEL	73,3 %
<i>Nicotiana tabacum</i>	MKLLGWMHRK	GFLAI GTLG-	SLGELFQ	--FHRKVHPE	WIKTDADYFVLEL	71,0 %
<i>Fragaria vesca</i>	MKLLGWMHRK	GFLAI GTFG-	SLGELFQ	--FHRKVHPE	WIKTDADYLVLEL	69,4 %
<i>Arabidopsis thaliana</i>	MKFWGWMHKK	GFLAI GTLG-	SLGELFQ	--FHRKVHPE	WIKTDEDYFVLEL	36,8 %
<i>Brassica napus</i>	MKFWGWMHKK	GFLAI GTLG-	SLGELFQ	--FHRKVHPE	WIKTDADYFVLEL	36,0 %
<i>Zea mays</i>	MKLLGWMHRK	GLTIGTLG-	SLGELFM	--FHRKVHPE	WIKTDAEYLVLEL	26,6 %
<i>Oryza sativa</i>	MKLLGWMHRK	GLTIGTLG-	SLGELFM	--FHRKVHPE	WIKTDADYLVLEL	25,7 %

Die festgestellten AS-Austausche befanden sich stets außerhalb dieser Motive, weshalb die Wahrscheinlichkeit einer Auswirkung der Mutationen auf die Proteinfunktion als gering erscheint. Dennoch soll erwähnt sein, dass neben konservativen AS-Austauschen auch nicht-konservative-AS-Austausche auftraten,

die potentiell einen Einfluss auf Funktion oder Struktur haben könnten. So bewerteten Epstein (1967), Grantham (1974) und Miyata et al. (1979) die Polarität und Größe der AS bzw. deren chemischen Unterschiede und die Mutationsrate, um hieraus einen Koeffizienten abzuleiten, der die Stärke des AS-Austausches einordnet. Ein großer Koeffizient lässt hierbei auf einen nicht konservativen AS-Austausch schließen. Somit können T173I (VviLAZY1) sowie P146R, R149P, P207L und P229I (VviTAC1) als nicht konservative AS-Austausche bewertet werden und sollten bei möglichen Auswirkungen auf die Proteinfunktion als erstes betrachtet werden (Tabelle 26).

Tabelle 26: Einteilung konservativer und nicht-konservativer AS-Austausche

AS-Austausch	Epstein (1967)	Grantham (1974)	Miyata et al. (1979)
D69E (VviLAZY1)	0,08	45	0,90
T173I (VviLAZY1)	0,80	89	2,14
A85T (VviTAC1)	0,41	58	0,90
L103V (VviTAC1)	0,03	32	0,91
P146R (VviTAC1)	1,02	103	2,90
R149P (VviTAC1)	1,02	103	2,90
R189K (VviTAC1)	0,05	26	0,40
D193N (VviTAC1)	0,00	23	0,65
P207L (VviTAC1)	0,05	98	2,70
P229I (VviTAC1)	0,05	95	2,62
Q259R (VviTAC1)	0,05	43	1,13
T289N (VviTAC1)	0,20	65	1,40

Die Sequenzanalysen hatten die Besonderheit, dass für *VviTAC1* bei den Sorten ‘Augster’, ‘Vermantino’ und ‘Sauvignon Blanc’ mehr als zwei Allele detektiert wurden, welches die Existenz von mehreren Genkopien zulassen würde. Beim Apfel (*Malus x domestica*) existieren für *TAC1* insgesamt zwei Genkopien auf Chromosom 1 und 7 (Wang et al. 2018). Diese beiden Chromosomen gingen während der Evolution des Apfelgenoms aus einer Duplikation hervor, welches die Erklärung für zwei Genkopien von *TAC1* liefert (Velasco et al. 2010). Die Weinrebe besitzt als diploide Pflanze ein Genom von 505 Mb, das sich auf 19 Chromosomen verteilt (Velasco et al. 2007). Das Genom hat jedoch keine Duplikation während der Evolution erfahren (Jaillon et al. 2007), was eine zweite Genkopie von *VviTAC1* als unwahrscheinlich erscheinen lässt. Bei genauerer Betrachtung der Sequenzanalysen fällt auf, dass der sequenzierte UTR-Bereich keine Unterschiede aufweist, welches beim Vorliegen von zwei Genkopien auf unterschiedlichen Chromosomen jedoch erwartet werden würde. Zudem wurden die zusätzlichen Allele nur einmalig detektiert und stellten

Kombinationen aus den anderen zwei Allelen dar. Die in der Phytozome-Datenbank hinterlegten Sequenzen für *TAC1* lassen ebenfalls vermuten, dass nur eine Genkopie von *VviTAC1* vorliegt. Somit wird geschlussfolgert, dass es sich bei den detektierten zusätzlichen Allelen um Chimäre handelt. Chimäre entstehen als Artefakte innerhalb einer PCR, indem unvollständige Amplifikate in folgenden PCR-Zyklen beim Annealing an eine unterschiedliche DNA-Matrize binden und bei der nun folgenden Amplifizierung mit der Sequenzabfolge der DNA-Matrize vervollständigt werden (Gao et al. 2012; Haas et al. 2011). Aus diesem Grund empfiehlt es sich, für Sequenzanalysen homozygot vorliegende Gene zu analysieren. Chimäre können jedoch auch über die Bedingungen der PCR reduziert werden, indem z.B. eine möglichst geringe Anzahl an PCR-Zyklen, eine abschließend verlängerte Elongationszeit oder eine Proof-reading-Polymerase verwendet werden (McInerney et al. 2014; Smyth et al. 2010).

Für *VviLAZY1* wurde ausschließlich eine Genkopie identifiziert. Sehr interessant ist jedoch, dass bei *Arabidopsis thaliana* eine Familie von sechs LAZY-Genen auftritt (Tabelle 27), die sich zum Teil über den Besitz von fünf konservierten Domänen auszeichnen (Abbildung 31).

Tabelle 27: LAZY-Genfamilie bei *A. thaliana* (entnommen aus Taniguchi et al. 2017)

Genname	ID Annotation	Synonym	Publikation
<i>LZY1</i>	At5g14090	<i>AtLAZY1</i>	(Yoshihara et al. 2013)
<i>LZY2</i>	At1g17400	<i>AtNGR1</i> <i>AtDRO3</i>	(Ge und Chen 2019) (Guseman et al. 2017)
<i>LZY3</i>	At1g72490	<i>AtNGR2</i> <i>AtDRO1</i>	(Ge und Chen 2019) (Guseman et al. 2017)
<i>LZY4</i>	At1g19115	<i>AtNGR3</i> <i>AtDRO2</i>	(Ge und Chen 2019) (Guseman et al. 2017)
<i>LZY5</i>	At3g24750	-	(Yoshihara et al. 2013)
<i>LZY6</i>	At3g27025	-	(Yoshihara et al. 2013)

Für *LZY1* als homologes Gen zu *VviLAZY1* ist eine Funktion im Gravitropismus für den Sprossbereich sowie für *LZY2* und *LZY3* nur für den Wurzelbereich nachgewiesen (Taniguchi et al. 2017). Für die Weinrebe wurde unter der Akzessionsnummer GSVIVG01033059001 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) ebenfalls ein zweites Gen gefunden, welches auf AS-Ebene eine Ähnlichkeit von 43 % zu *VviLAZY1* aufweist und die Domänen II, III und V von *VviLAZY1* besitzt. Eine Rolle innerhalb des Gravitropismus erscheint somit als nicht unwahrscheinlich, sodass es sich hierbei um ein weiteres Kandidatengen als großer Einflussfaktor für

die Pflanzenarchitektur handeln könnte. Dies zu untersuchen, wird in Zukunft von großem Interesse sein.

Eine weitere Besonderheit der Sequenzanalysen war, dass bei den Sorten 'Muscat Ottonel', 'Aramon Noir', 'Monastrell', 'Garnacha Tinta' und 'Barbera Nera' unterschiedliche Sequenzen auf genomischer und cDNA-Ebene gefunden wurden. Als mögliche Ursache hierfür wurde zunächst RNA-Editing vermutet. Unter anderem wurden jedoch Unterschiede von Adenin zu Thymin, Guanin zu Cytosin, Guanin zu Adenin oder auch Guanin zu Thymin detektiert. RNA-Editing beschränkt sich jedoch für gewöhnlich auf die Umwandlung von Cytosin zu Uracil oder Adenin zu Inosin, welches wie Guanin abgelesen wird (Takenaka et al. 2013). Aus diesem Grund wurde geschlossen, dass die Untersuchung unterschiedlichen Pflanzen- bzw. Sortenmaterials auf genomischer Ebene (Pflanzenmaterial 2014) und cDNA-Ebene (Pflanzenmaterial 2015) als Ursache auszumachen ist. Die wiederholte Sequenzanalyse von cDNA (Pflanzenmaterial 2017) bestätigte diese Vermutung, da diese in allen Fällen mit den genomischen Sequenzen übereinstimmte.

Somit wurde der kodierende Bereich der Kandidatengene *VviTAC1* und *VviLAZY1* untersucht. Beim Mais ist für *LAZY1* eine den Leserahmen verschiebende Insertion beschrieben, welche zu einem Funktionsverlust führt (Dong et al. 2013) sowie für Tomate eine Punktmutation, welche ein vorzeitiges Stoppcodon im vorhandenen homologen *TAC1*-Gen verursacht (González-Arcos et al. 2019). Derartige Mutationen wurden bei den eigens durchgeführten Sequenzanalysen im Exonbereich nicht festgestellt, weshalb ein potentieller Einfluss auf das Spleißverhalten betrachtet wurde. Mit GU bzw. AG existieren am 5'- bzw. 3'-Ende eines Introns definierte Grenzen (Clancy 2008). Eine A-Verzweigungsstelle in 18-40 nt Entfernung vom 3'-Ende ist ebenso essentiell für den Spleißvorgang. Diese Verzweigungsstelle ist häufig in der Erkennungssequenz YNYRAY (Y = Pyrimidin, N = jedes Nukleotid, R = Purin) eingebettet (Clancy 2008). Mutationen an den Intronengrenzen oder auch der Verzweigungsstelle sind häufige Ursachen für den Knockout eines Gens und auch z.B. für *TAC1* beim Reis (Yu et al. 2007), Pfirsich (Dardick et al. 2013) und Mais (Ku et al. 2011) beschrieben. Derartige Mutationen wurden für die untersuchten Kandidatengene jedoch nicht detektiert, womit es keine Hinweise für eine Einflussnahme auf das Spleißverhalten durch Mutationen gibt. Über die Sequenzanalysen und Restriktionsverdau auf cDNA-Ebene wurden zudem alle

festgestellten Haplotypen bestätigt (Abbildung 21), die auf AS-Ebene Unterschiede aufwiesen.

Da für mindestens 42 % aller Gene von *Arabidopsis thaliana* ein alternatives Spleißen beschrieben wird (Filichkin et al. 2010), wäre dies ebenso als Möglichkeit für *VviTAC1* und *VviLAZY1* zu untersuchen. Die Durchführung eines Northern-Blots wäre hierfür durchzuführen. Die Sequenzanalysen auf cDNA-Ebene lieferten jedoch zunächst keine Hinweise auf alternatives Spleißen.

5.3 Semiquantitative Transkriptanalysen für *VviTAC1* und *VviLAZY1*

Ein Knockout und somit eine fehlende Expression von *TAC1* oder *LAZY1* nehmen wie bereits erwähnt einen großen Einfluss auf die Pflanzenarchitektur, welches anhand der Auswirkungen auf den Phänotypen beim Pfirsich (Dardick et al. 2013), Reis (Li et al. 2007; Yu et al. 2007), Mais (Dong et al. 2013; Ku et al. 2011) und *Arabidopsis thaliana* (Yoshihara et al. 2013; Yoshihara und Spalding 2017) gezeigt werden konnte.

Zunächst wurde *VviGAPDH* für einen cDNA-Abgleich als Housekeeping-Gen benutzt. Dieses wurde auch speziell für die Weinrebe als stabiles Referenzgen beschrieben (Tashiro et al. 2016). Es gilt jedoch zu beachten, dass Housekeeping-Gene durch unterschiedliche experimentelle Bedingungen oder auch durch das Gewebe, in dem sie exprimiert werden, beeinflusst werden können (Selim et al. 2012). Demzufolge muss für einen gewebeübergreifenden Vergleich der Transkriptionsstärke stets auch bewiesen werden, dass ein solcher Vergleich zulässig ist. Dementsprechend sollen die untersuchten Gewebe Blatt, Nodium und Internodium in Hinblick auf ihre Transkriptionsstärke voneinander losgelöst betrachtet werden.

Die Expression beider Kandidatengene ist wie bei vielen anderen Genen auch abhängig vom Zeitpunkt, Gewebe und äußeren Einflussfaktoren. So wurde für *PpeTAC1* beim Pfirsich eine hohe Expression in den Verzweigungsstellen, den Blütenknospen und den apikalen Meristemen festgestellt. Die Expression war somit spezifisch für wachsende Gewebe und in ruhenden Geweben sehr gering (Dardick et al. 2013). Des Weiteren berichtet Tworkoski et al. (2015) von einer inversen Korrelation der *PpeTAC1*-Expression und der Auxinkonzentration im Spross. Für *ZmTAC1* beim Mais wurde eine hohe Expression in den Blattscheiden, Blattpulvini und dem Apikalmeristem festgestellt (Ku et al. 2011), wohingegen für *ZmLAZY1* eine

starke Expression in Nodien und eine schwache Expression in Internodien, Wurzeln und Blättern detektiert wurde (Dong et al. 2013). *PzTAC1* bei der Pappel wurde bei Xu et al. (2017) vorwiegend in Blättern und Spross exprimiert und *PzLAZY1* hauptsächlich im Sprossbereich und den Achselknospen. Transkriptanalysen von *MdoTAC1* beim Apfel zeigten eine Expression im Sprossspitzenbereich, den vegetativen Knospen und im Sporn und *MdoLAZY1* wiederum verstärkt in den Blättern, der Sprossspitze und vegetativen Knospen (Wang et al. 2018). Für Reis wiesen Transkriptanalysen eine hohe Expression von *OsTAC1* in der Basis der Verzweigungsstelle (Yu et al. 2007) und für *OsLAZY1* in der Blattscheide und den Pulvini auf (Li et al. 2007). Bei *Arabidopsis thaliana* wurde eine Expression von *AtTAC1* verstärkt im apikalen Bereich festgestellt (Dardick et al. 2013) und für *AtLAZY1* hauptsächlich in gravitationssensitiven Geweben (Koleoptile, Blattscheide, Blattspreite, Pulvini) (Yoshihara und Iino 2007) bzw. bei Dardick et al. (2013) in Teilen der Blüte und im zentralen Teil des Sprosses. Laterale Sprosse und basale Sektionen besaßen nur eine geringe Expression. Alle Analysen haben gemeinsam, dass keine Expression für *LAZY1* im Wurzelbereich gefunden wurde (Taniguchi et al. 2017).

Weiterhin konnten Transkriptanalysen zeigen, dass die Expression von *TAC1* und *LAZY1* stark lichtabhängig ist. So wird die Expression von *LAZY1* in Dunkelheit gefördert und unter Licht inhibiert (Dong et al. 2013). In der Promotorregion von *ZmLAZY1* finden sich hierzu passend 14 verschiedene Elemente, die in Zusammenhang mit einer Lichtantwort stehen. Weitere Elemente stehen in Zusammenhang mit einer Auxin-Antwort, welches aufgrund der Involvierung von *LAZY1* innerhalb des Gravitropismus und der hierbei stattfindenden Erzeugung eines Auxingradienten keine Überraschung darstellt (Dong et al. 2013; Zhang et al. 2018). Auch bei der Weinrebe lassen sich für *VviLAZY1* einige Promotorelemente im Kontext mit der Lichtregulierung finden, welches den Zusammenhang mit dem Faktor Licht nochmals unterstreicht (Tabelle A 6). Das Vorliegen eines EAR-Motivs (Ethylene-responsive element binding factor-associated Amphiphilic Repression) am C-Terminus unterstützt zudem die Vermutung, dass *VviLAZY1* eine Funktion als transkriptioneller Repressor innehaben könnte (Hill und Hollender 2019). Für *TAC1* wurden z.B. beim Pfirsich als auch im Rahmen dieser Arbeit innerhalb der Promotorregion ebenso zahlreiche lichtabhängige Motive gefunden. Die Transkription von *TAC1* wird im Gegensatz zu *LAZY1* durch Lichteinfluss jedoch induziert (Hill und

Hollender 2019; Waite und Dardick 2018). Weiterhin interessant erscheint, dass bei *VviTAC1* und *VviLAZY1* viele Elemente im Zusammenhang mit Amylaseaktivität als auch Wasserstress identifiziert wurden. Inwiefern Wasserstress ein wichtiger externer Stimulus für die Transkription der Kandidatengene ist oder die Amylaseaktivität im Netzwerk von *TAC1* und *LAZY1* eine bedeutende Rolle innehat, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Basierend auf den zugrundeliegenden Erkenntnissen wurde für *VviTAC1* bei aufrechten Sorten mit schmalen Verzweigungswinkeln eine geringe Transkription erwartet, die mit zunehmend hängender Triebhaltung sowie weiten Verzweigungswinkeln ansteigt. In Hinblick auf die untersuchten Pflanzenteile Nodium, Internodium und Blatt wurde für die Nodien und Internodien eine hohe Expression im Apikalbereich erwartet, die in basaler Richtung (ruhendes Gewebe) abnimmt. Ebenso wurde für Blätter eine niedrige Transkription erwartet. Für *VviLAZY1* wurde sowohl in den Nodien als auch Internodien eine hohe Expression von *VviLAZY1* erwartet. Aufgrund der Involvierung von *LAZY1* in den basipetalen Auxintransport wurde eine Transkription über den gesamten Spross erwartet. Ebenso wurde von einer Expression in den Blättern ausgegangen. Mit zunehmend hängender Triebhaltung wurde eine geringer werdende Transkription erwartet.

Dass für *VviTAC1* und *VviLAZY1* zu Boniturzeitpunkt I und somit einem sehr frühen Wachstumsstadium kein Transkriptnachweis erfolgte, war überraschend. Besonders für sich teilendes Gewebe wird in der Literatur von einer hohen Transkription der untersuchten Gene berichtet. So konnte für Sämlinge von *Arabidopsis thaliana* bei Yoshihara et al. (2013) mittels GUS-Assay eine vorhandene Expression von *AtLAZY1* im basal lateralen Sprossbereich nachgewiesen werden. Ursache hierfür könnte sein, dass die semiquantitative Analyse nicht ausreichend sensitiv für den Transkriptnachweis war und das Transkript unterhalb der Nachweisgrenze lag. Dass *VviTAC1* und *VviLAZY1* in frühen Entwicklungsstadien bei der Weinrebe noch eine untergeordnete Rolle spielen, könnte ebenfalls vermutet werden.

Die Ergebnisse für Boniturzeitpunkt II bestätigen ebenfalls nicht die Erwartungshaltung. So zeigten die aufrechten und halb aufrechten Sorten eine sehr starke *VviTAC1*-Transkription. 'Cabernet Sauvignon' und 'Sauvignon Blanc' stechen hierbei besonders hervor, wohingegen die waagerechten und halb hängenden Sorten 'Barbera Nera', 'Regent' und 'Aramon Noir' eine sehr geringe Transkription besaßen. Eine fehlende Transkription kann für die aufrechten Sorten somit nicht

ursächlich an der aufrechten Triebhaltung beteiligt sein. Es wurde anscheinend die natürliche Variabilität der Transkription von *VviTAC1* detektiert. Weiterhin überraschend war eine schwache Transkription im direkten Sprossspitzenbereich. Dieser Bereich, der die Wuchsrichtung vorgibt, wurde die höchste Aktivität erwartet. Auf Grundlage der Literatur war nicht klar, ob für *VviTAC1* und *VviLAZY1* im Blatt mit einer schwachen oder starken Transkription gerechnet werden kann. Mögliche Ursache für die festgestellte schwache Transkription in den eigens durchgeführten Versuchen könnte sein, dass das gesamte Blatt aufgearbeitet wurde. Bei Yoshihara et al. (2013) wurde beispielsweise beschrieben, dass die Transkription von *AtLAZY1* besonders in den Blattvenen lokalisiert ist. Durch Aufarbeitung des umliegenden nicht exprimierenden Gewebes ist es vorstellbar, dass die Konzentration der detektierbaren Transkripte herabgesetzt wurde.

Die Transkriptanalysen für *VviLAZY1* in den Nodien und Internodien zeigten bei den aufrechten Sorten 'Cabernet Sauvignon' und 'Sauvignon Blanc' eine hohe Transkription und bei 'Merzling' eine sehr schwache. Letzteres widerspricht der Erwartungshaltung. Es kann vermutet werden, dass die Ergebnisse wiederum den Bereich der genetischen Variabilität anzeigen, in dem durch das Kandidatengen kein unterschiedlicher Einfluss auf die Pflanzenarchitektur vorliegt. Die praktisch abwesende *VviLAZY1*-Transkription für 'Aramon Noir' war jedoch sehr interessant und wurde für fortführende Untersuchungen zunächst als mögliche Ursache für die halb hängende Triebhaltung aufgrund eines gestörten Gravitropismus in Betracht gezogen. Als letztes zeigten die Analysen zu Boniturzeitpunkt II eine von apikal nach basal zunehmende Transkription, welches über Boniturzeitpunkt III weiter verifiziert werden konnte.

Boniturzeitpunkt III bestätigte für die ausgewählten Sorten die erhaltenen Ergebnisse von Boniturzeitpunkt II im Apikalbereich. Wiederum konnte entgegen den Erwartungen für die aufrechten Sorten 'Merzling' und 'Monastrell' viel Transkript für *VviTAC1* und wenig Transkript für *VviLAZY1* im Nodien- und Internodienbereich nachgewiesen werden. Die halb hängenden bis hängenden Sorten 'Aramon Noir' und 'Couderc 3309' zeigten wenig Transkript für *VviTAC1* und im Vergleich zu den aufrechten Sorten ähnlich viel Transkript für *VviLAZY1*. Eine stark reduzierte Transkription von *VviLAZY1* für 'Aramon Noir' wie zu Boniturzeitpunkt II konnte somit nicht bestätigt werden. Ein Zusammenhang zwischen Triebhaltung und Genexpression der Kandidatengene erscheint bei den ausgewählten Sorten somit

als unwahrscheinlich. Demzufolge scheinen die identifizierten Sequenzunterschiede keinen offensichtlichen Einfluss auf die Transkriptionsrate von *VviTAC1* bzw. *VviLAZY1* zu haben. Es wäre zu schlussfolgern, dass die Ausbildung der Triebhaltung bei den untersuchten Sorten anderweitige genetische Ursachen hat. Weiterhin interessant erscheint, dass die Transkription von *VviTAC1* und *VviLAZY1* über die gesamte Sprosslänge anscheinend Minima und Maxima ausbildet. Ein erneuter Anstieg der Transkription beider Kandidatengene im basalen Sprossbereich wurde in der Literatur bisher ebenfalls noch nicht gezeigt. Dem zu Grunde liegende Ursachen und Auswirkungen erscheinen zunächst unklar. Die Weinrebe ist in der Literatur ebenso die erste Pflanze, welche für *TAC1* und *LAZY1* als Liane untersucht wurde. Die stark ausgeprägte Apikaldominanz unterscheidet sie somit wesentlich von den Süßgräsern Mais und Reis oder auch den Bäumen Pfirsich und Apfel, wo *TAC1* und *LAZY1* bisweilen eingehender untersucht wurden. Inwiefern dies einen Einfluss auf die Expression von *TAC1* und *LAZY1* hat, wird für zukünftige Untersuchungen ein interessanter Aspekt sein.

5.4 Korrelation von Triebhaltung und den Kandidatengenen bei S1-Populationen

Aufgrund des starken züchterischen Vorgangs bei der Weinrebe besitzt diese allgemein einen ausgeprägten heterozygoten Zustand des Genoms (Vezzulli et al. 2008). Dies erschwert die Identifizierung von molekularen Markern, da der Funktionsverlust eines Gens zumeist erst im homozygoten Zustand über die Merkmalsausprägung offensichtlich wird. Über Selbstungen erzeugte Populationen sollten dieses Problem lösen.

Spaltungsverhältnisse von 3:1 bzw. 1:3 (aufrecht : standard) für die Triebhaltung bei den Sorten 'Trollinger S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' ließen zwei Schlussfolgerungen zu: Zum einen wiesen diese darauf hin, dass einzelne dominante Gene für die Merkmalsausbildung verantwortlich sind und zum anderen, dass die Triebhaltung aufrecht bzw. standard dominant vererbt werden konnte. Dies weist somit auf unterschiedliche Gene hin, die für die Merkmalsausbildung verantwortlich sein müssen.

In Bezug auf die statistische Auswertung ist die Populationsgröße von 24-43 Individuen zu diskutieren. Bei Hale et al. (2012) wird in Zusammenhang mit der Allelfrequenz und der Allelverteilung innerhalb von Populationen sowie der Arbeit mit SSR-Markern eine Populationsgröße von 25-30 Individuen als Minimum angegeben.

Fung und Keenan (2014) widerspricht dem teilweise und gibt an, dass in Abhängigkeit von den Parametern des Experiments eine Populationsgröße von 22-94 Individuen notwendig sein kann. In beiden Fällen wären die vorhandenen Populationsgrößen als klein zu bewerten, welches die statistische Aussagekraft abschwächt. Größere Populationen würden dem entgegensteuern. Für die Planung der richtigen Populationsgröße ist es in Abhängigkeit vom Versuch auch möglich Software-Programme zur Hilfe zu nehmen (Excoffier und Lischer 2010; Hoban et al. 2013).

Sequenzanalysen der Elternpflanzen für 'Trollinger WE 4-7' und 'Trollinger S1' zeigten die Anwesenheit der gleichen Allelsequenzen für *VviTAC1* und *VviLAZY1* (Abbildung A 30 und Abbildung A 31). Insofern keine Mutationen innerhalb des Promotorbereiches vorliegen, welcher nicht untersucht wurde, kann ausgeschlossen werden, dass die Gensequenzen von *VviTAC1* und *VviLAZY1* ursächlich an der Merkmalsausprägung beteiligt sind. Für 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' wurden unterschiedliche Gensequenzen detektiert, welche auch zu AS-Austauschen führten, aber ansonsten keine Auffälligkeiten zeigten, die einen Einfluss auf die Genfunktion vermuten ließen. Die identifizierten AS-Austausche entsprachen den bei den Referenzsorten erfassten AS-Austauschen, welche über Komplementationsanalysen bei *Arabidopsis thaliana* für *VviTAC1* (Abbildung 28) und Wachstumsversuche für *VviLAZY1* (Abbildung 14) untersucht wurden, jedoch ohne Einfluss für die Proteinfunktion zu sein scheinen. Somit ist *VviTAC1* und *VviLAZY1* für die Populationen von 'Trollinger' und 'Spätburgunder' keine Einflussnahme auf die unterschiedliche Ausbildung der Triebhaltung zuzusprechen. SSR-Analysen bestätigten dies. Unter Verwendung des Pearson-Tests, welcher für die Berechnung von Korrelationskoeffizienten eine der gängigsten Methoden darstellt (Rodgers und Nicewander 1988), zeigten sich keine Korrelationen der Kandidatengene und des Merkmals Triebhaltung (Tabelle 20).

Untersuchungen innerhalb der S1-Populationen von 'Merzling' und 'Regent' ergaben, dass den AS-Austauschen D69E und T173I aufgrund ihres zufälligen Auftretens bei Pflanzen mit aufrechter als auch hängender Triebhaltung (Abbildung 24) kein Einfluss für die Proteinfunktion zuzuschreiben ist. Untersuchungen für ein Weinrebensortiment mit Sorten unterschiedlicher Triebhaltung bestätigten, dass das Auftreten dieser AS-Austausche zufällig war und in keinem Zusammenhang mit der Triebhaltung stand (Abbildung 25).

5.5 Komplementation von *Arabidopsis thaliana* durch *VviTAC1*

Komplementationsanalysen bei *Arabidopsis thaliana* über Agroinfiltration sind seit über zwei Jahrzehnten eine gängige Methode für die Untersuchung von Genfunktionen und wurde aus diesem Grund für die Untersuchung des Einflusses von AS-Austauschen auf die Proteinfunktion von *VviTAC1* und *VviLAZY1* angewandt (Clough und Bent 1998). Die Möglichkeit die verwendeten *attac1*- (SAIL_605_E02) und *atlazy1*-Einzelmutanten (GABI_591A12) mit Hilfe von *AtTAC1* und *AtLAZY1*-Überexpressionskonstrukten (35S-Promotor) zu komplementieren, wurde bei Dardick et al. (2013) und Yoshihara et al. (2013) bewiesen.

Die für die Komplementationsanalysen verwendeten Konstrukte für *VviTAC1* (Tabelle 9) deckten sämtliche identifizierten AS-Unterschiede ab, welche sämtliche nicht konservativen AS-Austausche mit einbezogen. Die Komplementation (Abbildung 28) zeigte, dass bei keinen der drei Linien in der T3-Generation (Konstrukte homozygot vorliegend) ein positiver oder negativer Einfluss der Konstrukte bzw. der AS-Austausche auf die Proteinfunktion existierte. Das Vorliegen von Homozygotie war wichtig, da ein heterozygoter Allelzustand in Bezug auf die Verzweigungswinkel einen intermediären Phänotypen erzeugt (Dardick et al. 2013). Der Phänotyp wurde vollständig wiederhergestellt, sodass sich für keine der Linien im Vergleich zum Wildtyp Col-0 in Hinblick auf die Verzweigungswinkel eine signifikante Abweichung ergab (Abbildung 28). Ein Einfluss auf weitere phänotypische Merkmale wurde nicht offensichtlich. Es gilt jedoch zu beachten, dass nicht für alle Linien mindestens drei unabhängige Transformationsereignisse vorlagen. Dies wird als Mindestanzahl angesehen, um gänzlich auszuschließen zu können, dass nicht die ungerichtete Übertragung der Konstrukte ins Genom, sondern die Expression der übertragenden Gene für eine Änderung des Phänotypen verantwortlich ist. Zudem sei erwähnt, dass die Überexpression durch den 35S Promotor nicht gewebe- oder entwicklungsspezifisch erfolgt (Odell et al. 1985). Unerwünschte Nebeneffekte für den Phänotypen sind somit nie auszuschließen. Aus diesem Grund wäre es von Vorteil, für die Transformation Konstrukte herzustellen, bei welchem der 35S Promoter durch den *TAC1*-Promotor aus *Arabidopsis thaliana* ersetzt wird. Zudem wäre als Positivkontrolle die Transformation mit einem *AtTAC1*-Konstrukt empfehlenswert. Es kann bestätigt werden, dass die Komplementation von *attac1* mit

allen Überexpressionskonstrukten aus der Weinrebe funktionierte und Auswirkungen auf den Phänotyp dem zu untersuchenden Konstrukt zuzuschreiben waren.

Dass für das Überexpressionskonstrukt von *VviLAZY1* keine Transformanten erhalten wurden, wird mit der geringen Anzahl an Blüten und der hiermit verbundenen geringen Menge an Saatgut begründet. Über an Yoshihara et al. (2013) angelegte Wachstumsversuche (Abbildung 14) konnte jedoch festgestellt werden, dass sämtliche Referenzweinrebsorten dazu befähigt waren Gravitation wahrzunehmen, was eine Störung des *LAZY1*-Genes ausschließt, da Mutationen in diesem Gen eine direkte Störung des Gravitropismus zur Folge haben würden.

5.6 VIGS bei der Weinrebe

Virus-induced-gene-silencing (VIGS) ist eine Vektortechnologie, welche den natürlichen Abwehrmechanismus gegen Viren über RNA-Interferenz ausnutzt und es ermöglicht die Funktion von Genen zu untersuchen (Baulcombe 1999). *Tobacco mosaic virus* (TMV), *Tobacco rattle virus* (TRV) und *Potato virus X* (PVX) sind für diese Technologie typische Beispiele (Lu 2003), können jedoch bei der Weinrebe keine Anwendung finden. Die natürlicherweise bei der Weinrebe vorkommenden Viren *Grapevine Rupestris stem pitting-associated virus* (GRSPaV), *Grapevine Virus A* (GVA) und *Grapevine leafroll-associated virus-2* (GLRAV-2) ermöglichen VIGS aber auch bei der Weinrebe (Jelly et al. 2014) und sollten im Fall der letzten beiden innerhalb dieser Arbeit für ein RNA-Silencing der Gene *VviPDS*, *VviTAC1* und *VviLAZY1* eingesetzt werden.

GVA aus der Familie der *Flexiviridae* ist ein durch Mehlkäfer und Holzbearbeitung übertragender Virus und verursacht als Symptom beispielsweise die Blattrollkrankheit (Martelli et al. 2007). Das Genom umfasst 7,4 kb und fünf ORFs, welche für die Replikation (ORF1), Bewegung des Virus (ORF3), als Hüllprotein (ORF4) sowie als Suppressor von RNA-Silencing (ORF5) (Abbildung A 9) fungieren (Muruganantham et al. 2009). GLRAV-2 gehört zur Familie der *Closteroviridae* bzw. der Closteroviren, welche eine Genomgröße von 15,5-19,5 kb besitzen. Typische Bestandteile des Genoms sind eine RNA-Methyltransferase (MET), RNA-Helikase (HEL), Transmembranproteine, welche die Bewegung von Zelle zu Zelle ermöglichen (p6), Hüllproteine (CP), Proteine für den Virionzusammenbau (Hsp70h), RNA abhängige RNA-Polymerase (POL), Papain-like leader Proteinase (L1 und L2) für die Amplifizierung des viralen Genoms sowie Repressoren von RNA-Silencing (p21 und

p19) (Abbildung A 8) (Dolja et al. 2006; Dolja und Koonin 2013). Als Krankheitssymptom wird die Blattrollkrankheit und Blattchlorose ausgelöst, welche zu Ertragsminderung führen und im Anbau weltweit ein Problem darstellen (Al Rwahnih et al. 2012). Eine Übertragung erfolgt hauptsächlich über den Vorgang der Pfropfung (Kurth et al. 2012).

Beide Vektorkonstrukte basieren auf RNA-Silencing und ziehen keine Veränderung des Weinrebengenoms nach sich, was einen Vorteil gegenüber der Erzeugung gentechnischer Organismen und den für diese geltenden Einschränkungen darstellt (Kurth et al. 2012). Weiterer Vorteil der Vektoren ist, dass die Infektion einer mechanischen Verletzung bedarf, damit diese ins Phloem eindringen können, welches wiederum eine unkontrollierte Verbreitung verhindert (Kurth et al. 2012). Von Nachteil ist jedoch der bei beiden Vektoren vorliegende langsame Infektionszyklus und die natürliche Limitierung der Replikation auf das Phloem, was eine verzögerte systemische Ausbreitung nach sich zieht. In den Publikationen von Kurth et al. (2012) und Muruganantham et al. (2009) wurde ein RNA-Silencing der Gene *PDS* (*Phytoen-Desaturase*) und *ChlI* (Untereinheit I der *Magnesium-Protoporphyrin IX Chelatase*) erreicht. Dies zog einen Verlust von Chlorophyll und somit ein Ausbleichen der Blätter nach sich (Kurth et al. 2012), womit die Funktionsweise der Vektorkonstrukte bewiesen wurde. Das in Kurth et al. (2012) erzeugte Vektorkonstrukt besitzt den weiteren Vorteil einer GFP-Expression und somit die Möglichkeit des Konstruktachweises in Zellen über Fluoreszenzmikroskopie. Als negativer Aspekt ist jedoch hervorzuheben, dass das RNA-Silencing von *PDS* und *ChlI* in beiden Publikationen nicht vollständig war. Dies stellt in Frage, inwieweit eine Auswirkung eines unvollständigen RNA-Silencings von *VviTAC1* und *VviLAZY1* auf die Triebhaltung zu erwarten wäre.

Der Genotyp einer Weinrebe bestimmt maßgeblich über die Transformierbarkeit, welches z.B. mit der Sensitivität gegenüber Agrobakterien in Zusammenhang steht (Saporta et al. 2017). Bei Kurth et al. (2012) stellten sich besonders die Sorten 'Syrah' und 'Cabernet franc' als besonders empfänglich für die VIGS-Methode heraus, weshalb diese Sorten mitgeführt wurden. Da bei keiner Pflanze die Vektoren nachgewiesen werden konnten, ist die Ursache in der Infiltrationsmethode zu suchen. Die Agroinfiltration von Blättern (Santos-Rosa et al. 2008) sowie in vitro kultivierter Pflanzen (Zottini et al. 2008) ist für die transiente Transformation bei der Weinrebe mehrfach beschrieben. Auch für eine erfolgreiche stabile Transformation

existieren in der Literatur einige Beispiele. Für diese musste bisher jedoch nach der gentechnischen Veränderung einzelner Zellen der Weg über Embryo- oder Organogenese gegangen werden, welches durch die schlechte Regenerationsfähigkeit der Weinrebe enorm erschwert ist (Saporta et al. 2017). Dementsprechend sind auch Methoden, die von Protoplasten ausgehen, bei der Weinrebe ungeeignet (Jelly et al. 2014).

Die Möglichkeit der transienten Transformation unter Gewächshausbedingungen kultivierter Pflanzen wäre ein enormer Vorteil mit Zeit- und Arbeitsersparnis, um die Funktion eines Gens bei Weinreben schnell zu untersuchen. Die Blattstruktur scheint jedoch für die einfache Infiltration mittels einer Spritze über die Blattunterseite und den Stomataöffnungen, welches eine gängige Methode darstellt, ein Hindernis darzustellen. So wurde bei Ben-Amar et al. (2013) ein Protokoll beschrieben, welches sich der Vakuum-Infiltration bedient. Entscheidende Faktoren waren die Verwendung von Pflanzen im richtigen Wachstumsstadium (frisch angezogene Pflanzen nach 3-4 Wochen im 3- bis 4-Blattstadium), der schnelle Wechsel von Vakuum auf Normaldruck, die chemische Senkung der Oberflächenspannung der verwendeten Flüssigkeit, die Infiltration am Morgen (Stomataöffnungen geöffnet), der Zusatz von Acetosyringon (natürlicher Lockstoff für Agrobakterien) sowie die leichte Verletzung der Pflanzen (z.B. durch Anritzen oder Ultraschall, welches Acetosyringon freisetzt). Der ausgebliebene Erfolg der Methodik nach Ben-Amar et al. (2013) sowie des Versuches der Infiltration während des Wässerns der Holzsteckling während der Anzucht könnte vielerlei Ursachen haben. Die Wiederholung und gegebenenfalls Optimierung der Methodik sind somit von großer Wichtigkeit, um den Einfluss von *VviTAC1* und *VviLAZY1* abschließend bewerten zu können.

5.7 Biologische Rolle von *TAC1* und *LAZY1* und deren Bedeutung

Die Erschließung der konkreten biologischen Funktion von *TAC1* und *LAZY1* ist Gegenstand gegenwärtiger Forschung. *TAC1* besitzt keine Domänen bekannter biologischer Funktion, weshalb sich die Zuordnung einer Rolle als schwierig gestaltet (Hollender et al. 2018). Bei Waite und Dardick (2018) sowie Hill und Hollender (2019) wird jedoch von einer lichtabhängigen Regulierung berichtet. So wird *TAC1* in Dunkelheit reprimiert und unter Licht induziert. Diese Regulierung ist graduell und unabhängig von Blau-, Rot- und Infrarotlicht (Waite und Dardick 2018). Eine Überexpression von *TAC1* vermindert zudem das schmalere werden von

Verzweigungswinkeln in Dunkelheit (Waite und Dardick 2018). Der Zusammenhang der Expression von *TAC1* und des Faktor Lichtes wird durch das Vorhandensein lichtabhängiger Motive im Promotorbereich unterstützt (Waite und Dardick 2018), welche, wie bereits beschrieben, auch bei der Weinrebe auftreten. Bei Waite und Dardick (2018) wird weiterhin geschlussfolgert, dass *TAC1* ein funktionierendes Photosystem II benötigt und mit seiner Funktion downstream der Photosynthese gelegen sein muss.

Auch für *LAZY1* ist die biologische Funktion nicht gänzlich aufgeklärt. In der Promotorregion von Mais befinden sich vier Elemente für eine Auxinantwort, vierzehn Elemente für eine Reaktion auf Licht sowie ein Element des circadianen Rhythmus (Dong et al. 2013). Mit Ausnahme eines Elementes der circadianen Rhythmik, welches stattdessen bei *VviTAC1* gefunden wurde, decken sich diese Ergebnisse mit *VviLAZY1*. Hierzu passend zeigten *LAZY1*-Mutanten beim Mais für dutzende Gene, welche im Auxin-Transport, einer Auxinantwort oder der Reaktion auf Licht involviert sind, eine veränderte Expression (Dong et al. 2013). Somit wird auch *LAZY1* durch externe und interne Stimuli reguliert, indem es in Antwort auf Auxin hoch- und in Antwort auf Licht herunterreguliert wird (Dong et al. 2013). Weiterhin interessant ist das Vorliegen einer NLS-Sequenz und Transmembranhelix für *LAZY1* bei einigen Pflanzenarten (Howard et al. 2014; Li et al. 2007). Das NLS-Motiv tritt auch bei der Weinrebe auf. Für die Transmembrandomäne existiert kein Bereich, der als signifikant betrachtet werden kann. Inwiefern diese Elemente für die Funktion von Bedeutung sind, ist jedoch zu hinterfragen. So ist bei *Arabidopsis thaliana* *LAZY1* über das C-terminale Ende an der Plasmamembran lokalisiert, wobei sich die Transmembrandomäne jedoch am N-terminalen Ende von *LAZY1* befindet (Sasaki und Yamamoto 2015). Für die NLS-Sequenz wurde gezeigt, dass dessen Mutation und die hiermit ausbleibende Lokalisierung im Kern keinen Einfluss auf die Ausbildung des Phänotypen von *Arabidopsis thaliana* nahm (Yoshihara et al. 2013). Das Vorhandensein eines EAR-Motivs am C-terminalen Ende könnte bei *LAZY1* für die Funktion als Transkriptionsfaktor sprechen, da diese Elemente dafür bekannt sind Gene innerhalb der Auxin-Antwort zu unterdrücken (Dardick et al. 2013; Hollender und Dardick 2015). Der Gehalt an IAA wurde bei Sang et al. (2014) jedoch bei gleichbleibender Auxin-Biosynthese nicht beeinflusst. Entscheidend war, dass es zu einer Veränderung des Transportes kam, indem der polare Auxintransport gesteigert und der laterale Auxintransport gestört wurde (Sang et al. 2014). Dies geschieht

anscheinend über die Regulierung der Relokalisierung von PIN-Proteinen an der Plasmamembran, welche die wichtigsten Efflux carrier von Auxin darstellen und somit sehr stark an der Erzeugung eines Auxingradienten als richtungsweisendes Wachstumssignal beteiligt sind (Kobayashi et al. 2019). So wurde für PIN3, welches die Lokalisierung von Auxin in der Wurzel stark beeinflusst, gezeigt, dass dessen Expression und die hiermit verbundene asymmetrische Verteilung in der Wurzelkappe durch LAZY1 reguliert wird (Ge und Chen 2019; Taniguchi et al. 2017). Aufgrund der entscheidenden Bedeutung des Transportprozesses kann auch eine externe Auxingabe oder eine Überexpression von Auxingenen eine Mutation bei *LAZY1* oder *PIN*-Genen nicht retten (Chen et al. 2014).

Bei *Arabidopsis thaliana* existieren innerhalb der *LAZY*-Genfamilie sechs Gene, welche spross- oder wurzelspezifisch exprimiert werden (Taniguchi et al. 2017). Es kann somit angenommen werden, dass die Lokalisierung sprossspezifischer PIN-Proteine (z.B. PIN1 und PIN2) durch *LAZY*-Gene reguliert wird. Das Vorliegen eines zweiten *LAZY*-Genes (GSVIVG01033059001) bei der Weinrebe, lässt den wichtigen Einfluss dieser Gene auch bei der Weinrebe vermuten. Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Funktion von *LAZY1* ist, dass die Amyloplasten-Sedimentation bei *LAZY1*-Mutanten unbeeinflusst ist. Die Funktion von *LAZY1* muss sich somit nach der Amyloplasten-Sedimentation und vor der Auxin-Verteilung befinden (Taniguchi et al. 2017). Dass bei stärkelosen Mutanten ohne den Besitz von Amyloplasten gravitropische Antworten vorhanden sind, spricht für die Existenz eines zweiten Weges der Gravitationswahrnehmung (Yoshihara und Iino 2007).

LAZY1 befindet sich somit innerhalb eines Netzwerkes der Gravitationswahrnehmung in Zusammenhang mit PIN-Proteinen, welches immer weiter entschlüsselt wird. So kontrolliert PINOID als Kinase die basale bzw. apikale Lokalisierung von PIN-Proteinen (Furutani et al. 2004; Teichmann und Muhr 2015), welches wiederum in seiner Aktivität von PDK1 (Phosphoinositide-dependent protein kinase) moduliert wird (Kolesnikov et al. 2016; Zegzouti et al. 2006). Die Proteine PINOID bzw. PP2A, wirken antagonistisch und phosphorylieren bzw. dephosphorylieren PIN-Proteine, welche einen Einfluss auf die Lokalisierung nehmen (Xi et al. 2016). D6PK (D6 protein kinase) hat über Phosphorylierung wiederum einen Effekt auf die Aktivität von PIN-Proteinen (Adamowski und Friml 2015; Willige et al. 2013). Die Proteine GNOM und GOLVEN sowie Calcium sind weitere Elemente, welche einen Einfluss auf die Lokalisierung von PIN-Proteinen nehmen (Kolesnikov

et al. 2016; Rakusová et al. 2011; Whitford et al. 2012). *HSFA2D* ist ein für *LAZY1* upstream gelegener positiver Regulator, welcher als Antwort auf die Gravistimulation die Transkription von *LAZY1* induziert (Zhang et al. 2018). Weitere Bestandteile innerhalb des Netzwerkes sind bekannt. Ein nächster Schritt wird sein, die konkrete Wirkungsweise von *LAZY1* aufzudecken.

5.8 Weitere Kandidatengene für die Beeinflussung des Verzweigungswinkels

Nicht nur *TAC1* und *LAZY1* sind dazu in der Lage die Pflanzenarchitektur zu beeinflussen. So wurden bei Sun et al. (2016) beim Raps über Genome Wide Association Studies (GWAS) eine Vielzahl von Genorten identifiziert, die einen Einfluss auf die Ausbildung des Verzweigungswinkels ausüben. Hierbei standen 48 Gene im Zusammenhang mit der asymmetrischen Auxinverteilung, zehn Gene mit der Gravitationswahrnehmung, fünf Gene mit dem Gravitationssignalweg, fünf Gene mit der Organkrümmung sowie neun Gene mit reaktiven Sauerstoffspezies, Phototropismus, Ethylen und Strigolacton. Wie bei der Weinrebe wurden auch hier zwei unterschiedliche Gene der *LAZY*-Familie identifiziert. In einer Studie von Liu et al. (2016) wurden 25 Loci identifiziert, welche beim Raps im direkten Zusammenhang mit der Ausbildung des Verzweigungswinkels standen. Neben den *LAZY*-orthologen Genen beinhaltet dies beispielsweise die Gene *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN LIKE 14* (*SPL14*) und *Gretchen Hagen 3* (*GH3*) als Gen der Auxinantwort. Die Ergebnisse von Sun et al. (2016) zeigten, dass Gene in Zusammenhang mit der Auxinbiosynthese oder dem Auxintransport eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Pflanzenarchitektur einnehmen. Als konkrete Beispiele hierfür können IDD14, IDD15 und IDD16 (Indeterminate domain) aus *Arabidopsis thaliana* genannt werden, welche den Transport und die Synthese von Auxin regulieren (Cui et al. 2013). Maßgeblich beeinflusst wird der Auxintransport, wie schon mehrfach erwähnt, ebenfalls von PIN-Proteinen durch deren Aktivität und Lokalisierung. Faktoren, die in dieses Netzwerk mit reinspielen, sind zahlreich. Übersichtsartikel von Adamowski und Friml (2015), Armengot et al. (2016) und Kolesnikov et al. (2016) bieten hierfür einen guten Einblick.

Neben Auxin besitzt auch das Pflanzenhormon Strigolacton einen maßgeblichen Einfluss für die Pflanzenarchitektur, indem es dazu in der Lage ist, den Auxintransport zu reduzieren (Xu et al. 2015).

Neben *TAC1* sind beim Reis die Gene *LPA1* (*Loose plant architecture*) und *PROG1* (*Prostrate growth 1*) eingehend untersucht worden. *PROG1* ist ein nukleärer Zink-Finger-Transkriptionsfaktor und kontrolliert den Verzweigungswinkel sowie die Verzweigungsanzahl (Jin et al. 2008; Tan et al. 2008). *LPA1* ist als orthologes Gen zu IDD15 in *Arabidopsis thaliana* (Zhang et al. 2018) in den Sprossgravitropismus involviert, indem es die Sedimentationsrate von Amyloplasten beeinflusst (Wu et al. 2013). Auch dies sind jedoch nur vereinzelte konkrete Beispiele. Die Anzahl von Genen, welche die Pflanzenarchitektur und den Verzweigungswinkel in Signal-, Transport- und Biosynthesewegen beeinflussen, ist sehr groß.

5.9 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit konnte unter Gewächshausbedingungen für das Merkmal Triebhaltung nach dem Boniturschlüssel OIV 006 der optimale Boniturzeitpunkt festgelegt und eine umfassende phänotypische Charakterisierung von 13 Referenzweinrebsorten durchgeführt werden. Ein Zusammenhang einer aufrechten Triebhaltung und schmaler Triebwinkel sowie einer zunehmend hängenden Triebhaltung und weiter werdenden Triebwinkeln konnte gezeigt werden. Die Gene *TAC1* und *LAZY1* wurden erstmalig bei der Weinrebe im großen Umfang über Sequenzanalysen, Transkriptanalysen, SSR-Analysen, Komplementationsanalysen, Wachstumsversuchen und VIGS bei Referenzsorten sowie S1-Populationen untersucht. Es konnte zum Teil eine große Variabilität auf Sequenzebene sowie eine gewebe- und zeitpunktspezifische Expression der Kandidatengene ermittelt werden, welche in Zukunft für die fortführende Charakterisierung der Gene von Nutzen sein wird. Die Auswertung aller Datensätze ergab jedoch, dass *TAC1* und *LAZY1* bei den untersuchten Sorten der Weinrebe nicht ursächlich an der Ausbildung einer unterschiedlichen Triebhaltung beteiligt sind. Es wird die Aufgabe zukünftiger Arbeiten sein, Sorten oder Pflanzen bei der Weinrebe zu identifizieren, welche über Mutationen in *VviTAC1* und *VviLAZY1* verfügen, die wiederum einen Einfluss auf die Proteinfunktion und somit potentiell den Phänotypen nehmen. Wie bei zahlreichen weiteren Pflanzenarten auch, ist zu vermuten, dass dies die Bedeutung von *TAC1* und *LAZY1* für die Pflanzenarchitektur bei der Weinrebe herausstellen wird. Auf dieser Grundlage wird die Entwicklung molekularer Marker und während des züchterischen Vorgangs eine frühzeitige Selektion auf das Merkmal einer aufrechten Triebhaltung möglich sein.

Literaturverzeichnis

- Adamowski, Maciek; Friml, Jiří** (2015): PIN-dependent auxin transport: action, regulation, and evolution. *The plant cell* 27 (1), 20–32. DOI: 10.1105/tpc.114.134874.
- Adams, K.; Jakob, L.; Schumann, F.** (1997): Weinkompedium. Artikel 431. Neustadt an der Weinstraße: Verein der Absolventen der Staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt für Landwirtschaft, Weinbau und Gartenbau.
- Al Rwahnih, Maher; Dolja, Valerian V.; Daubert, Steve; Koonin, Eugene V.; Rowhani, Adib** (2012): Genomic and biological analysis of Grapevine leafroll-associated virus 7 reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus research* 163 (1), 302–309. DOI: 10.1016/j.virusres.2011.10.018.
- Altschul, Stephen** (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25 (17), 3389–3402. DOI: 10.1093/nar/25.17.3389.
- Altschul, Stephen; Gish, Warren; Miller, Webb; Myers, Eugene; Lipman, David** (1990): Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* (215), 403–410.
- Altschul, Stephen F.; Wootton, John C.; Gertz, E. Michael; Agarwala, Richa; Morgulis, Aleksandr; Schäffer, Alejandro A.; Yu, Yi-Kuo** (2005): Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *The FEBS journal* 272 (20), 5101–5109. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x.
- Armengot, Laia; Marquès-Bueno, Maria Mar; Jaillais, Yvon** (2016): Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases. *Journal of experimental botany* 67 (14), 4015–4037. DOI: 10.1093/jxb/erw216.
- Bai, Tuanhui; Zhu, Yuandi; Fernández-Fernández, Felicidad; Keulemans, Johan; Brown, Susan; Xu, Kenong** (2012): Fine genetic mapping of the Co locus controlling columnar growth habit in apple. *Molecular genetics and genomics* 287 (5), 437–450. DOI: 10.1007/s00438-012-0689-5.
- Bajguz, Andrzej; Hayat, Shamsul** (2009): Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant physiology and biochemistry* 47 (1), 1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002.
- Bari, Rajendra; Jones, Jonathan D. G.** (2009): Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant molecular biology* 69 (4), 473–488. DOI: 10.1007/s11103-008-9435-0.
- Barré, Pierre; Herzog, Katja; Höfle, Rebecca; Hullin, Matthias B.; Töpfer, Reinhard; Steinhage, Volker** (2019): Automated phenotyping of epicuticular waxes of grapevine berries using light separation and convolutional neural networks. *Computers and electronics in agriculture* 156, 263–274. DOI: 10.1016/j.compag.2018.11.012.
- Bauer, Karl** (2015): Weinbau. 10. Aufl. Wien: Österreichischer Agrarverl. (AV-Fachbuch).
- Baulcombe, David C.** (1999): Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Current opinion in plant biology* (2), 109–113. DOI: 10.1016/S1369-5266(99)80022-3.
- Becker, Arno; Götz, Gerd; Rebholz, Franz** (2012): Rebschnitt. Weintrauben und Tafeltrauben richtig schneiden. Stuttgart (Hohenheim): Ulmer (Weinbau Edition 2014). Online verfügbar unter http://www.content-select.com/index.php?id=bib_view&ean=9783800190164.
- Ben-Amar, Anis; Cobanov, Pascal; Buchholz, Guenther; Mliki, Ahmed; Reustle, Goetz** (2013): In planta agro-infiltration system for transient gene expression in grapevine (*Vitis* spp.). *Acta physiology plant* 35 (11), 3147–3156. DOI: 10.1007/s11738-013-1348-0.
- Bennett, Tom; Leyser, Ottoline** (2014): Strigolactone signalling: standing on the shoulders of DWARFs. *Current opinion in plant biology* 22, 7–13. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.08.001.
- Broeckx, Laura S.; Verlinden, Melanie S.; Vangronsveld, Jaco; Ceulemans, Reinhart** (2012): Importance of crown architecture for leaf area index of different *Populus* genotypes in a high-density plantation. *Tree physiology* 32 (10), 1214–1226. DOI: 10.1093/treephys/tps083.

- Busov, Victor B.** (2018): Manipulation of Growth and Architectural Characteristics in Trees for Increased Woody Biomass Production. *Frontiers in plant science* 9, 1505. DOI: 10.3389/fpls.2018.01505.
- Chen, Qingguo; Dai, Xinhua; De-Paoli, Henrique; Cheng, Youfa; Takebayashi, Yumiko; Kasahara, Hiroyuki et al.** (2014): Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in *Arabidopsis* roots. *Plant and cell physiology* 55 (6), 1072–1079. DOI: 10.1093/pcp/pcu039.
- Clancy, Suzanne** (2008): RNA Splicing: introns, exons and spliceosome. *Nature education* (1), 31.
- Clough, Steven J.; Bent, Andrew F.** (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* (16), 735–743. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1998.00343.x.
- Cosloy, Sharon; Oishi, Michio** (1973): The nature of the transformation process in *Escherichia coli* K12. *Molecular & general genetics* (124), 1–10. DOI: 10.1007/BF00267159.
- Cui, Dayong; Zhao, Jingbo; Jing, Yanjun; Fan, Mingzhu; Liu, Jing; Wang, Zhicai et al.** (2013): The *Arabidopsis* *IDD14*, *IDD15*, and *IDD16* cooperatively regulate lateral organ morphogenesis and gravitropism by promoting auxin biosynthesis and transport. *PLoS genetics* 9 (9), e1003759. DOI: 10.1371/journal.pgen.1003759.
- Dardick, Chris; Callahan, Ann; Horn, Renate; Ruiz, Karina B.; Zhebentyayeva, Tetyana; Hollender, Courtney et al.** (2013): *PpeTAC1* promotes the horizontal growth of branches in peach trees and is a member of a functionally conserved gene family found in diverse plants species. *The plant journal : for cell and molecular biology* 75 (4), 618–630. DOI: 10.1111/tpj.12234.
- Di Genova, Alex; Almeida, Andrea M.; Munoz-Espinoza, Claudia; Vizoso, Paula; Travisany, Dante; Moraga, Carol et al.** (2014): Whole genome comparison between table and wine grapes reveals a comprehensive catalog of structural variants. *BMC plant biology* (14). DOI: 10.1186/1471-2229-14-7.
- Divilov, Konstantin; Wiesner-Hanks, Tyr; Barba, Paola; Cadle-Davidson, Lance; Reisch, Bruce I.** (2017): Computer vision for high-throughput quantitative phenotyping: A case study of grapevine downy mildew sporulation and leaf trichomes. *Phytopathology* 107 (12), 1549–1555. DOI: 10.1094/PHYTO-04-17-0137-R.
- Dolja, Valerian V.; Koonin, Eugene V.** (2013): The closterovirus-derived gene expression and RNA interference vectors as tools for research and plant biotechnology. *Frontiers in microbiology* 4, 83. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00083.
- Dolja, Valerian V.; Kreuze, Jan F.; Valkonen, Jari P. T.** (2006): Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus research* 117 (1), 38–51. DOI: 10.1016/j.virusres.2006.02.002.
- Dong, Zhaobin; Jiang, Chuan; Chen, Xiaoyang; Zhang, Tao; Ding, Lian; Song, Weibin et al.** (2013): Maize *LAZY1* mediates shoot gravitropism and inflorescence development through regulating auxin transport, auxin signaling, and light response. *Plant physiology* 163 (3), 1306–1322. DOI: 10.1104/pp.113.227314.
- Doyle, Jeffrey** (1991): CTAB Total DNA Isolation. *Molecular techniques in taxonomy* (Vol. H 57), 283–284.
- Epstein, Charles J.** (1967): Non-randomness of amino-acid changes in the evolution of homologous proteins. *Nature* (215), 355–359. DOI: 10.1038/215355a0.
- Excoffier, Laurent; Lischer, Heidi E. L.** (2010): Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources* 10 (3), 564–567. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- Filichkin, Sergei A.; Priest, Henry D.; Givan, Scott A.; Shen, Rongkun; Bryant, Douglas W.; Fox, Samuel E. et al.** (2010): Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome research* 20 (1), 45–58. DOI: 10.1101/gr.093302.109.

- Fukaki, Hidehiro; Tameda, Satoshi; Masuda, Haruka; Tasaka, Masao** (2002): Lateral root formation is blocked by a gain-of-function mutation in the *SOLITARY-ROOT/IAA 14* gene of *Arabidopsis*. In: *The plant journal* (29), 153–168. DOI: 10.1046/j.0960-7412.2001.01201.x
- Fung, Tak; Keenan, Kevin** (2014): Confidence intervals for population allele frequencies: the general case of sampling from a finite diploid population of any size. *PloS one* 9 (1), e85925. DOI: 10.1371/journal.pone.0085925.
- Furutani, Masahiko; Vernoux, Teva; Traas, Jan; Kato, Takehide; Tasaka, Masao; Aida, Mitsuhiro** (2004): *PIN-FORMED1* and *PINOID* regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development (Cambridge, England)* 131 (20), 5021–5030. DOI: 10.1242/dev.01388.
- Gambino, Giorgio; Perrone, Irene; Gribaudo, Ivana** (2008): A Rapid and effective method for RNA extraction from different tissues of grapevine and other woody plants. *Phytochemical analysis : PCA* 19 (6), 520–525. DOI: 10.1002/pca.1078.
- Gao, Runlin; Zhao, Anna H.; Du, Y.; Ho, Wanting T.; Fu, Xueqi; Zhao, Z. J.** (2012): PCR artifacts can explain the reported biallelic *JAK2* mutations. *Blood cancer journal* 2 (2), e56. DOI: 10.1038/bcj.2012.2.
- Ge, Liangfa; Chen, Rujin** (2019): Negative gravitropic response of roots directs auxin flow to control root gravitropism. *Plant, cell and environment*. DOI: 10.1111/pce.13559.
- Gomez-Roldan, Victoria; Fermas, Soraya; Brewer, Philip B.; Puech-Pagès, Virginie; Dun, Elizabeth A.; Pillot, Jean-Paul et al.** (2008): Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455 (7210), 189–194. DOI: 10.1038/nature07271.
- González-Arcos, Matías; Noronha Fonseca, Maria Esther de; Zandonadi, Daniel Basílio; Peres, Lázaro E. P.; Arruabarrena, Ana; Ferreira, Demetrios S. et al.** (2019): A loss-of-function allele of a *TAC1*-like gene (*SITAC1*) located on tomato chromosome 10 is a candidate for the *Erectoid leaf* (*Erl*) mutation. *Euphytica* 215 (5), 76. DOI: 10.1007/s10681-019-2418-1.
- Goodstein, David M.; Shu, Shengqiang; Howson, Russell; Neupane, Rochak; Hayes, Richard D.; Fazo, Joni et al.** (2012): Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research* 40 (Database issue), D1178-86. DOI: 10.1093/nar/gkr944.
- Grantham, Richard** (1974): Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185 (4154), 862–864. DOI: 10.1126/science.185.4154.862.
- Guseman, Jessica M.; Webb, Kevin; Srinivasan, Chinnathambi; Dardick, Chris** (2017): *DRO1* influences root system architecture in *Arabidopsis* and *Prunus* species. *The plant journal : for cell and molecular biology* 89 (6), 1093–1105. DOI: 10.1111/tpj.13470.
- Haas, Brian J.; Gevers, Dirk; Earl, Ashlee M.; Feldgarden, Mike; Ward, Doyle V.; Giannoukos, Georgia et al.** (2011): Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome research* 21 (3), 494–504. DOI: 10.1101/gr.112730.110.
- Hale, Marie L.; Burg, Theresa M.; Steeves, Tammy E.** (2012): Sampling for microsatellite-based population genetic studies: 25 to 30 individuals per population is enough to accurately estimate allele frequencies. *PloS one* 7 (9), e45170. DOI: 10.1371/journal.pone.0045170.
- Hall, Thomas** (1999): BioEdit - a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows. *Nucleic acids symposium series* (41), 95–98.
- Harrison, Samuel J.; Mott, Ellie K.; Parsley, Kate; Aspinall, Sue; Gray, John C.; Cottage, Amanda** (2006): A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant methods* 2, 19. DOI: 10.1186/1746-4811-2-19.
- He, Jiwei; Shao, Gaoneng; Wei, Xiangjin; Huang, Fenglin; Sheng, Zhonghua; Tang, Shaoqing; Hu, Peisong** (2017): Fine mapping and candidate gene analysis of *qTAC8*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice (*Oryza sativa* L.). *PloS one* 12 (5), e0178177. DOI: 10.1371/journal.pone.0178177.

- Hellens, Roger P.; Edwards, E. Anne; Leyland, Nicola R.; Bean, Samantha; Mullineaux, Philip M.** (2000): pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant molecular biology* 42 (6), 819–832. DOI: 10.1023/A:1006496308160.
- Higo, Kenichi; Ugawa, Yoshihiro; Iwamoto, Masao; Korenaga, Tomoko** (1999): Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic acids research* (27), 297–300. DOI: 10.1093/nar/27.1.297.
- Hill, Joseph L.; Hollender, Courtney A.** (2019): Branching out: new insights into the genetic regulation of shoot architecture in trees. *Current opinion in plant biology* 47, 73–80. DOI: 10.1016/j.pbi.2018.09.010.
- Hoban, Sean; Gaggiotti, Oscar; Bertorelle, Giorgio** (2013): Sample Planning Optimization Tool for conservation and population Genetics (SPOTG): a software for choosing the appropriate number of markers and samples. *Methods Ecology Evolution* 4 (3), 299–303. DOI: 10.1111/2041-210x.12025.
- Höfgen, Rainer; Willmitzer, Lothar** (1988): Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic acids research* (16), 9877.
- Hofmann, K.; Stoffel, W.** (1993): A database of membrane spanning protein segment. *Biology chemistry Hoppe-Seyler* (374).
- Hollender, Courtney A.; Dardick, Chris** (2015): Molecular basis of angiosperm tree architecture. *The new phytologist* 206 (2), 541–556. DOI: 10.1111/nph.13204.
- Hollender, Courtney A.; Waite, Jessica M.; Tabb, Amy; Raines, Doug; Chinnithambi, Srinivasan; Dardick, Chris** (2018): Alteration of *TAC1* expression in *Prunus* species leads to pleiotropic shoot phenotypes. *Horticulture research* 5, 26. DOI: 10.1038/s41438-018-0034-1.
- Howard, Thomas P.; Hayward, Andrew P.; Tordillos, Anthony; Fragoso, Christopher; Moreno, Maria A.; Tohme, Joe et al.** (2014): Identification of the maize gravitropism gene lazy plant1 by a transposon-tagging genome resequencing strategy. *PloS one* 9 (1), e87053. DOI: 10.1371/journal.pone.0087053.
- Jacob, Helmut B.** (2010): Breeding experiments of apple varieties with columnar growth and low chilling requirements. *Acta horticulturae*. (872), 159–164. DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.872.19.
- Jaillon, Olivier; Aury, Jean-Marc; Noel, Benjamin; Policriti, Alberto; Clepet, Christian; Casagrande, Alberto et al.** (2007): The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* 449 (7161), 463–467. DOI: 10.1038/nature06148.
- Jelly, Noémie S.; Valat, Laure; Walter, Bernard; Maillot, Pascale** (2014): Transient expression assays in grapevine: a step towards genetic improvement. *Plant biotechnology journal* 12 (9), 1231–1245. DOI: 10.1111/pbi.12294.
- Jiang, Jiahuan; Tan, Lubin; Zhu, Zuofeng; Fu, Yongcai; Liu, Fengxia; Cai, Hongwei; Sun, Chuanqing** (2012): Molecular evolution of the *TAC1* gene from rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of genetics and genomics* 39 (10), 551–560. DOI: 10.1016/j.jgg.2012.07.011.
- Jin, Jian; Huang, Wei; Gao, Ji-Ping; Yang, Jun; Shi, Min; Zhu, Mei-Zhen et al.** (2008): Genetic control of rice plant architecture under domestication. *Nature genetics* 40 (11), 1365–1369. DOI: 10.1038/ng.247.
- Julin, Douglas A.** (2018): Blue/White Selection. In: **Robert D. Wells, Judith S. Bond, Judith P. Klinman, Bettie Sue Siler Masters und Ellis Bell** (Hg.): Molecular life sciences. An encyclopedic reference, Bd. 7. New York, NY: Springer (Springer reference), 72–73.
- Kadisich, Erwin; Müller, Edgar** (Hg.) (2008): Weinbau. 3., vollst. neu bearb. Aufl. Stuttgart: Ulmer (Der Winzer, 1).
- Kagale, Sateesh; Rozwadowski, Kevin** (2011): EAR motif-mediated transcriptional repression in plants. *Epigenetics* 6 (2), 141–146. DOI: 10.4161/epi.6.2.13627.

- Kicherer, Anna; Herzog, Katja; Bendel, Nele; Klück, Hans-Christian; Backhaus, Andreas; Wieland, Markus et al.** (2017): Phenoliner: A New Field Phenotyping Platform for Grapevine Research. *Sensors (Basel, Switzerland)* 17 (7). DOI: 10.3390/s17071625.
- Kim, Joo-Young; Ryu, Jae Yong; Baek, Kon; Park, Chung-Mo** (2016): High temperature attenuates the gravitropism of inflorescence stems by inducing *SHOOT GRAVITROPISM 5* alternative splicing in *Arabidopsis*. *The new phytologist* 209 (1), 265–279. DOI: 10.1111/nph.13602.
- Kobayashi, Akie; Kim, Hye-Jeong; Tomita, Yuta; Miyazawa, Yutaka; Fujii, Nobuharu; Yano, Sachiko et al.** (2019): Circumnutational movement in rice coleoptiles involves the gravitropic response: analysis of an agravitropic mutant and space-grown seedlings. *Physiologia plantarum* 165 (3), 464–475. DOI: 10.1111/ppl.12824.
- Kolesnikov, Yaroslav S.; Kretynin, Serhiy V.; Volotovskiy, Igor D.; Kordyum, Elizabeth L.; Ruelland, Eric; Kravets, Volodymyr S.** (2016): Molecular mechanisms of gravity perception and signal transduction in plants. *Protoplasma* 253 (4), 987–1004. DOI: 10.1007/s00709-015-0859-5.
- Kosugi, Shunichi; Hasebe, Masako; Tomita, Masaru; Yanagawa, Hiroshi** (2009): Systematic identification of cell cycle-dependent yeast nucleocytoplasmic shuttling proteins by prediction of composite motifs. *PNAS* (106), 10171–10176. DOI: 10.1073/pnas.0900604106.
- Ku, Lixia; Wei, Xiaomin; Zhang, Shaofang; Zhang, Jun; Guo, Shulei; Chen, Yanhui** (2011): Cloning and characterization of a putative *TAC1* ortholog associated with leaf angle in maize (*Zea mays* L.). *PloS one* 6 (6), e20621. DOI: 10.1371/journal.pone.0020621.
- Kurth, Elizabeth G.; Peremyslov, Valera V.; Prokhnevsky, Alexey I.; Kasschau, Kristin D.; Miller, Marilyn; Carrington, James C.; Dolja, Valerian V.** (2012): Virus-derived gene expression and RNA interference vector for grapevine. *Journal of virology* 86 (11), 6002–6009. DOI: 10.1128/JVI.00436-12.
- Li, Peijin; Wang, Yonghong; Qian, Qian; Fu, Zhiming; Wang, Mei; Zeng, Dali et al.** (2007): *LAZY1* controls rice shoot gravitropism through regulating polar auxin transport. *Cell research* 17 (5), 402–410. DOI: 10.1038/cr.2007.38.
- Liu, Jia; Wang, Wenxiang; Mei, Desheng; Wang, Hui; Fu, Li; Liu, Daoming et al.** (2016): Characterizing variation of branch angle and genome-wide association mapping in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Frontiers in plant science* 7, 21. DOI: 10.3389/fpls.2016.00021.
- Lu, R.** (2003): Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30 (4), 296–303. DOI: 10.1016/S1046-2023(03)00037-9.
- Mandel, M.; Higa, A.** (1970): Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *Journal of molecular biology* 53 (1), 159–162. DOI: 10.1016/0022-2836(70)90051-3.
- Martelli, Giovanni P.; Adams, Michael J.; Kreuze, Jan F.; Dolja, Valerian V.** (2007): Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Annual review of phytopathology* 45, 73–100. DOI: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094401.
- McInerney, Peter; Adams, Paul; Hadi, Masood Z.** (2014): Error rate comparison during Polymerase chain reaction by DNA Polymerase. *Molecular biology international* 2014, 287430. DOI: 10.1155/2014/287430.
- Miyata, Takashi; Miyazawa, Sanzo; Yasunaga, Teruo** (1979): Two types of amino acid substitutions in protein evolution. *Journal of molecular evolution* (12), 219–236.
- Müller, Bruno; Sheen, Jen** (2007): Advances in cytokinin signaling. *Science (New York, N.Y.)* 318 (5847), 68–69. DOI: 10.1126/science.1145461.
- Muruganantham, Mookkan; Moskovitz, Yoni; Haviv, Sabrina; Horesh, Tamar; Fenigstein, Annie; Du Preez, Jacques et al.** (2009): Grapevine virus A-mediated gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Vitis vinifera*. *Journal of virological methods* 155 (2), 167–174. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.10.010.

- Odell, Joan T.; Nagy, Ferenc; Chua, Nam-Hai** (1985): Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature* (313), 810–812. DOI: 10.1038/313810a0.
- Okada, Kazuma; Wada, Masato; Moriya, Shigeki; Katayose, Yuichi; Fujisawa, Hiroko; Wu, Jianzhong et al.** (2016): Expression of a putative dioxygenase gene adjacent to an insertion mutation is involved in the short internodes of columnar apples (*Malus × domestica*). *Journal of plant research* 129 (6), 1109–1126. DOI: 10.1007/s10265-016-0863-7.
- Perrin, Robyn M.; Young, Li-Sen; Murthy U M, Narayana; Harrison, Benjamin R.; Wang, Yan; Will, Jessica L.; Masson, Patrick H.** (2005): Gravity signal transduction in primary roots. *Annals of botany* 96 (5), 737–743. DOI: 10.1093/aob/mci227.
- Popiolkowski, Lisa** (2018): Phänotypisierung in Hinblick auf die Pflanzenarchitektur bei der Sonnenblume und bei der Weinrebe. *Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Abteilung Pflanzengenetik*.
- Rakusová, Hana; Gallego-Bartolomé, Javier; Vanstraelen, Marleen; Robert, Hélène S.; Alabadí, David; Blázquez, Miguel A. et al.** (2011): Polarization of *PIN3*-dependent auxin transport for hypocotyl gravitropic response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 67 (5), 817–826. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04636.x.
- Rodgers, Joseph L.; Nicewander, W. Alan** (1988): Thirteen ways to look at the correlation coefficient. *The american statistician* 42 (1), 59–66. DOI: 10.1080/00031305.1988.10475524.
- Rose, Johann Christian; Kicherer, Anna; Wieland, Markus; Klingbeil, Lasse; Töpfer, Reinhard; Kuhlmann, Heiner** (2016): Towards automated large-scale 3D phenotyping of vineyards under field conditions. *Sensors (Basel, Switzerland)* 16 (12). DOI: 10.3390/s16122136.
- Rosso, Mario G.; Li, Yong; Strizhov, Nicolai; Reiss, Bernd; Dekker, Koen; Weisshaar, Bernd** (2003): An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant molecular biology* 53 (1-2), 247–259. DOI: 10.1023/B:PLAN.0000009297.37235.4a.
- Roy, Ambrish; Kucukural, Alper; Zhang, Yang** (2010): I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature protocols* 5 (4), 725–738. DOI: 10.1038/nprot.2010.5.
- Roychoudhry, Suruchi; Kepinski, Stefan** (2015): Shoot and root branch growth angle control-the wonderfulness of lateralness. *Current opinion in plant biology* 23, 124–131. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.12.004.
- Sang, Dajun; Chen, Dongqin; Liu, Guifu; Liang, Yan; Huang, Linzhou; Meng, Xiangbing et al.** (2014): Strigolactones regulate rice tiller angle by attenuating shoot gravitropism through inhibiting auxin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (30), 11199–11204. DOI: 10.1073/pnas.1411859111.
- Santos-Rosa, M.; Poutaraud, A.; Merdinoglu, D.; Mestre, P.** (2008): Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. *Plant cell reports* 27 (6), 1053–1063. DOI: 10.1007/s00299-008-0531-z.
- Saporta, R.; San Pedro, Tania; Gisbert, Carmina** (2017): Attempts at grapevine (*Vitis vinifera* L.) breeding through genetic transformation: The main limiting factors. *Journal of grapevine research*, 55, (4), 173-186. DOI: 10.5073/VITIS.2016.55.173-186.
- Sasaki, Shu; Yamamoto, Kotaro T.** (2015): *Arabidopsis* LAZY1 is a peripheral membrane protein of which the carboxy-terminal fragment potentially interacts with microtubules. *Plant biotechnology* 32 (1), 103–108. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.15.0106a.
- Sato, Ethel Mendocilla; Hijazi, Hussein; Bennett, Malcolm J.; Vissenberg, Kris; Swarup, Ranjan** (2015): New insights into root gravitropic signalling. *Journal of experimental botany* 66 (8), 2155–2165. DOI: 10.1093/jxb/eru515.
- Sauer, Michael; Balla, Jozef; Luschnig, Christian; Wisniewska, Justyna; Reinöhl, Vilém; Friml, Jiri; Benková, Eva** (2006): Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback

- regulation of PIN polarity. *Genes and development* 20 (20), 2902–2911. DOI: 10.1101/gad.390806.
- Schumann, Fritz** (2002): Historische Rebenerziehungsarten in der Pfalz. Sonderdruck. Stuttgart: Franz Steiner Verlag.
- Selim, M.; Legay, S.; Berkelmann-Löhnertz, B.; Langen, G.; Kogel, K-H; Evers, D.** (2012): Identification of suitable reference genes for real-time RT-PCR normalization in the grapevine-downy mildew pathosystem. *Plant cell reports* 31 (1), 205–216. DOI: 10.1007/s00299-011-1156-1.
- Sessions, A.** (2002): A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The plant cell online* 14 (12), 2985–2994. DOI: 10.1105/tpc.004630.
- Smyth, R. P.; Schlub, T. E.; Grimm, A.; Venturi, V.; Chopra, A.; Mallal, S. et al.** (2010): Reducing chimera formation during PCR amplification to ensure accurate genotyping. *Gene* 469 (1-2), 45–51. DOI: 10.1016/j.gene.2010.08.009.
- Sun, Chengming; Wang, Benqi; Wang, Xiaohua; Hu, Kaining; Li, Kaidi; Li, Zhanyu et al.** (2016): Genome-wide association study dissecting the genetic architecture underlying the branch angle trait in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Scientific reports* 6, 33673. DOI: 10.1038/srep33673.
- Takenaka, Mizuki; Zehrmann, Anja; Verbitskiy, Daniil; Härtel, Barbara; Brennicke, Axel** (2013): RNA editing in plants and its evolution. *Annual review of genetics* 47, 335–352. DOI: 10.1146/annurev-genet-111212-133519.
- Tan, Lubin; Li, Xianran; Liu, Fengxia; Sun, Xianyou; Li, Chenggang; Zhu, Zuofeng et al.** (2008): Control of a key transition from prostrate to erect growth in rice domestication. *Nature genetics* 40 (11), 1360–1364. DOI: 10.1038/ng.197.
- Taniguchi, Masatoshi; Furutani, Masahiko; Nishimura, Takeshi; Nakamura, Moritaka; Fushita, Toyohito; Iijima, Kohta et al.** (2017): The *Arabidopsis* *LAZY1* family plays a key role in gravity signaling within statocytes and in branch angle control of roots and shoots. *The plant cell* 29 (8), 1984–1999. DOI: 10.1105/tpc.16.00575.
- Tashiro, Rebecca M.; Philips, Joshua G.; Winefield, Christopher S.** (2016): Identification of suitable grapevine reference genes for qRT-PCR derived from heterologous species. *Molecular genetics and genomics* 291 (1), 483–492. DOI: 10.1007/s00438-015-1081-z.
- Teichmann, Thomas; Muhr, Merlin** (2015): Shaping plant architecture. *Frontiers in plant science* 6, 233. DOI: 10.3389/fpls.2015.00233.
- This, Patrice; Lacombe, Thierry; Thomas, Mark R.** (2006): Historical origins and genetic diversity of wine grapes. In: *Trends in genetics* 22 (9), 511–519. DOI: 10.1016/j.tig.2006.07.008.
- Tian, Huiyu; Smet, Ive de; Ding, Zhaojun** (2014): Shaping a root system: regulating lateral versus primary root growth. *Trends in plant science* 19 (7), 426–431. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.01.007.
- Tu, Qiang; Yin, Jia; Fu, Jun; Herrmann, Jennifer; Li, Yuezhong; Yin, Yulong et al.** (2016): Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Scientific reports* 6, 24648. DOI: 10.1038/srep24648.
- Tworowski, Thomas; Webb, Kevin; Callahan, Ann** (2015): Auxin levels and *MAX1–4* and *TAC1* gene expression in different growth habits of peach. *Plant growth regulation* 77 (3), 279–288. DOI: 10.1007/s10725-015-0062-x.
- Velasco, Riccardo; Zharkikh, Andrey; Affourtit, Jason; Dhingra, Amit; Cestaro, Alessandro; Kalyanaraman, Ananth et al.** (2010): The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature genetics* 42 (10), 833–839. DOI: 10.1038/ng.654.
- Velasco, Riccardo; Zharkikh, Andrey; Troggio, Michela; Cartwright, Dustin A.; Cestaro, Alessandro; Pruss, Dmitry et al.** (2007): A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PloS one* 2 (12), e1326. DOI: 10.1371/journal.pone.0001326.

- Vezzulli, Silvia; Micheletti, Diego; Riaz, Summaira; Pindo, Massimo; Viola, Roberto; This, Patrice et al.** (2008): A SNP transferability survey within the genus *Vitis*. *BMC plant biology* 8, 128. DOI: 10.1186/1471-2229-8-128.
- Waite, Jessica M.; Dardick, Chris** (2018): *TILLER ANGLE CONTROL 1* modulates plant architecture in response to photosynthetic signals. *Journal of experimental botany* 69 (20), 4935–4944. DOI: 10.1093/jxb/ery253.
- Wang, Hui; Cheng, Hongtao; Wang, Wenxiang; Liu, Jia; Hao, Mengyu; Mei, Desheng et al.** (2016): Identification of *BnaYUCCA6* as a candidate gene for branch angle in *Brassica napus* by QTL-seq. *Scientific reports* 6, 38493. DOI: 10.1038/srep38493.
- Wang, Limin; Cai, Wenbo; Du, Chuanhui; Fu, Yan; Xie, Xuan; Zhu, Yuandi** (2018): The isolation of the IGT family genes in *Malus × domestica* and their expressions in four idiotypic apple cultivars. *Tree genetics and genomes* 14 (4), 5227. DOI: 10.1007/s11295-018-1258-9.
- Whitford, Ryan; Fernandez, Ana; Tejos, Ricardo; Pérez, Amparo Cuéllar; Kleine-Vehn, Jürgen; Vanneste, Steffen et al.** (2012): GOLVEN secretory peptides regulate auxin carrier turnover during plant gravitropic responses. *Developmental cell* 22 (3), 678–685. DOI: 10.1016/j.devcel.2012.02.002.
- Willige, Björn C.; Ahlers, Siv; Zourelidou, Melina; Barbosa, Inês C. R.; Demarsy, Emilie; Trevisan, Martine et al.** (2013): D6PK AGCVIII kinases are required for auxin transport and phototropic hypocotyl bending in *Arabidopsis*. *The plant cell* 25 (5), 1674–1688. DOI: 10.1105/tpc.113.111484.
- Woodward, Andrew W.; Bartel, Bonnie** (2005): Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany* 95 (5), 707–735. DOI: 10.1093/aob/mci083.
- Wu, Xinru; Tang, Ding; Li, Ming; Wang, Kejian; Cheng, Zhukuan** (2013): Loose Plant Architecture1, an INDETERMINATE DOMAIN protein involved in shoot gravitropism, regulates plant architecture in rice. *Plant physiology* 161 (1), 317–329. DOI: 10.1104/pp.112.208496.
- Xi, Wanyan; Gong, Ximing; Yang, Qiaoyun; Yu, Hao; Liou, Yih-Cherng** (2016): Pin1At regulates PIN1 polar localization and root gravitropism. *Nature communications* 7, 10430. DOI: 10.1038/ncomms10430.
- Xu, Dong; Qi, Xiao; Li, Jihong; Han, Xiaojiao; Wang, Jinnan; Jiang, Yuezhong et al.** (2017): PzTAC and PzLAZY from a narrow-crown poplar contribute to regulation of branch angles. *Plant physiology and biochemistry* 118, 571–578. DOI: 10.1016/j.plaphy.2017.07.011.
- Xu, Junxu; Zha, Manrong; Li, Ye; Ding, Yanfeng; Chen, Lin; Ding, Chengqiang; Wang, Shaohua** (2015): The interaction between nitrogen availability and auxin, cytokinin, and strigolactone in the control of shoot branching in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant cell reports* 34 (9), 1647–1662. DOI: 10.1007/s00299-015-1815-8.
- Yang, Jianyi; Yan, Renxiang; Roy, Ambrish; Xu, Dong; Poisson, Jonathan; Zhang, Yang** (2015): The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods* 12 (1), 7–8. DOI: 10.1038/nmeth.3213.
- Yoshihara, Takeshi; Iino, Moritoshi** (2007): Identification of the gravitropism-related rice gene *LAZY1* and elucidation of *LAZY1*-dependent and -independent gravity signaling pathways. In: *Plant & cell physiology* 48 (5), S. 678–688. DOI: 10.1093/pcp/pcm042.
- Yoshihara, Takeshi; Spalding, Edgar P.** (2017): *LAZY* genes mediate the effects of gravity on auxin gradients and plant architecture. *Plant physiology* 175 (2), 959–969. DOI: 10.1104/pp.17.00942.
- Yoshihara, Takeshi; Spalding, Edgar P.; Iino, Moritoshi** (2013): *AtLAZY1* is a signaling component required for gravitropism of the *Arabidopsis thaliana* inflorescence. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 74 (2), 267–279. DOI: 10.1111/tpj.12118.
- Yu, Baisheng; Lin, Zhongwei; Li, Haixia; Li, Xiaojiao; Li, Jiayang; Wang, Yonghong et al.** (2007): *TAC1*, a major quantitative trait locus controlling tiller angle in rice. *The plant journal : for cell and molecular biology* 52 (5), 891–898. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2007.03284.x.

- Zegzouti, Hicham; Anthony, Richard G.; Jahchan, Nadine; Bögre, Laszlo; Christensen, Sioux K.** (2006): Phosphorylation and activation of PINOID by the phospholipid signaling kinase 3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) in *Arabidopsis*. *PNAS* (103), 6404–6409.
- Zhang, Jianzhi; Yang, Jian-Rong** (2015): Determinants of the rate of protein sequence evolution. *Nature reviews. Genetics* 16 (7), 409–420. DOI: 10.1038/nrg3950.
- Zhang, Ning; Yu, Hong; Yu, Hao; Cai, Yueyue; Huang, Linzhou; Xu, Cao et al.** (2018): A core regulatory pathway controlling rice tiller angle mediated by the *LAZY1*-dependent asymmetric distribution of auxin. *The Plant cell* 30 (7), 1461–1475. DOI: 10.1105/tpc.18.00063.
- Zhang, Xiuren; Henriques, Rossana; Lin, Shih-Shun; Niu, Qi-Wen; Chua, Nam-Hai** (2006): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols* 1 (2), 641–646. DOI: 10.1038/nprot.2006.97.
- Zhang, Yang** (2008): I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC bioinformatics* 9, 40. DOI: 10.1186/1471-2105-9-40.
- Zhao, Hua; Huai, Zexun; Xiao, Yingjie; Wang, Xiaohua; Yu, Jiangyan; Ding, Guangda; Peng, Junhua** (2014): Natural variation and genetic analysis of the tiller angle gene *MsTAC1* in *Miscanthus sinensis*. *Planta* 240 (1), 161–175. DOI: 10.1007/s00425-014-2070-x.
- Zottini, Michela; Barizza, Elisabetta; Costa, Alex; Formentin, Elide; Ruberti, Cristina; Carimi, Francesco; Lo Schiavo, Fiorella** (2008): Agroinfiltration of grapevine leaves for fast transient assays of gene expression and for long-term production of stable transformed cells. *Plant cell reports* 27 (5), 845–853. DOI: 10.1007/s00299-008-0510-4.

Anhang

Tabelle A 1: TAC1 homologe Proteine bei verschiedenen Pflanzenarten

Pflanze	NCBI-Sequence-ID	Pflanze	NCBI-Sequence-ID
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XM_021029410.1	<i>Morus notabilis</i>	XP_010100689.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_001202835.1	<i>Nelum bonucifera</i>	XP_010267458.1
<i>Brassica napus</i>	XP_013707994.1	<i>Nicotiana attenuata</i>	XP_019253476.1
<i>Brassica oleracea</i>	XM_013778303.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016476250.1
<i>Brassica rapa</i>	XP_009142619.1	<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009777850.1
<i>Citrus clementina</i>	XP_006444775.1	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XP_009607464.1
<i>Citrus sinensis</i>	XM_006491273.2	<i>Noccaea caerulea</i>	JAU30086.1
<i>Camelina sativa</i>	XP_010518342.1	<i>Oryza sativa</i>	XM_015756705.1
<i>Capsella rubella</i>	XP_006293507.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007135290.1
<i>Cephalotus follicularis</i>	GAV65759.1	<i>Prunus mume</i>	XP_008233087.1
<i>Corchorus capsularis</i>	OMO64237.1	<i>Prunus persica</i>	XM_020557806.1
<i>Cucumis melo</i>	XP_008459743.1	<i>Populus euphratica</i>	XP_011038821.1
<i>Cucumis sativus</i>	XP_011656860.1	<i>Populus trichocarpa</i>	XP_002320217.1
<i>Daucus carota</i>	XP_017218222.1	<i>Pyrus x bretschneideri</i>	XP_009375443.1
<i>Eucalyptus grandis</i>	KCW71462.1	<i>Raphanus sativus</i>	XP_018437063.1
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006397856.1	<i>Ricinus communis</i>	EEF29053.1
<i>Fragaria vesca</i>	XP_004306634.2	<i>Solanum lycopersicum</i>	KFK37427.1
<i>Gossypium arboreum</i>	XP_017630075.1	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015089381.1
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016704040.1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XP_010523825.1
<i>Gossypium raimondii</i>	XM_012634700.1	<i>Theobroma cacao</i>	XP_007051471.2
<i>Jatropha curcas</i>	XP_012083136.1	<i>Trifolium subterraneum</i>	GAU29494.1
<i>Juglans regia</i>	XP_018846781.1	<i>Vitis vinifera</i>	XM_010663179.2
<i>Malus domestica</i>	XM_008355829.2	<i>Zea mays</i>	NM_001177173.1
<i>Manihot esculenta</i>	OAY48963.1	<i>Ziziphus jujuba</i>	XP_015869614.1

Tabelle A 2: LAZY1 homologe Proteine bei verschiedenen Pflanzenarten

Pflanze	NCBI-Sequence-ID	Pflanze	NCBI-Sequence-ID
<i>Arabidopsis lyrata</i>	XP_002871601.1	<i>Ipomoea nil</i>	XP_019199824.1
<i>Arabidopsis thaliana</i>	OAO90935.1	<i>Jatropha curcas</i>	XP_012067555.1
<i>Arabidopsis lyrata</i>	KFK25639.1	<i>Lupinus angustifolius</i>	XP_019458317.1
<i>Arachis duranensis</i>	XP_015971304.1	<i>Malus domestica</i>	XP_008362103.1
<i>Arachis ipaensis</i>	XP_016162223.1	<i>Manihot esculenta</i>	OAY37260.1
<i>Brassica napus</i>	CDX70541.1	<i>Medicago truncatula</i>	XP_003622164.2
<i>Brassica oleracea</i>	XP_013628018.1	<i>Morus notabilis</i>	XP_010112393.1
<i>Brassica rapa</i>	XP_009121698.1	<i>Nelumbo nucifera</i>	XP_010250652.1
<i>Camelina sativa</i>	XP_010453523.1	<i>Nicotiana attenuata</i>	XP_019229652.1
<i>Capsella rubella</i>	XP_006288042.1	<i>Nicotiana sylvestris</i>	XP_009771615.1
<i>Capsicum annuum</i>	XP_016546667.1	<i>Nicotiana tabacum</i>	XP_016443934.1
<i>Citrus clementina</i>	XP_006447030.1	<i>Nicotiana tomentosiformis</i>	XP_009591285.1
<i>Citrus sinensis</i>	KDO63890.1	<i>Noccaea caerulea</i>	JAU81904.1
<i>Corchorus capsularis</i>	OMO85423.1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	XP_007161667.1
<i>Corchorus olitorius</i>	OMO99386.1	<i>Populus euphratica</i>	XP_011000964.1
<i>Cucumis melo</i>	XP_008450129.1	<i>Raphanus sativus</i>	XP_018446054.1
<i>Eucalyptus grandis</i>	XP_010028982.1	<i>Ricinus communis</i>	XP_002512909.1
<i>Eutrema salsugineum</i>	XP_006399919.1	<i>Solanum lycopersicum</i>	XP_004239242.1
<i>Fragaria vesca</i>	XP_011457500.1	<i>Solanum pennellii</i>	XP_015074913.1
<i>Glycine max</i>	XP_006604154.1	<i>Tarenaya hassleriana</i>	XP_010550214.1
<i>Glycine soja</i>	KHN28283.1	<i>Theobroma cacao</i>	XP_017975117.1
<i>Gossypium arboreum</i>	XP_017614307.1	<i>Vigna angularis</i>	XP_017419369.1
<i>Gossypium hirsutum</i>	XP_016747945.1	<i>Vigna radiata</i>	XP_014523851.1
<i>Gossypium raimondii</i>	XP_012460932.1	<i>Ziziphus jujuba</i>	XP_015870437.1

Tabelle A 3: Genotypisierung über SSR-Analysen bei den Sorten ‘Trollinger S1’, ‘Trollinger WE 4-7’, ‘Spätburgunder Clevner’ und ‘Spätburgunder FR 52-78’

Primerpaar	Kopplungsgruppe	Entfernung zum Genlocus	Farbstoff
GF01-09	Chr. 1	1,03 cM	Fam (blau)
GF01-15	Chr. 1	0,05 cM	Tamra (gelb)
GF01-10	Chr. 1	1,55 cM	Fam (blau)
GF01-14	Chr. 1	1,94 cM	Tamra (gelb)
GF15-05	Chr. 15	0,17 cM	Rex (rot)
VMC8G3.2	Chr. 15	1,78 cM	Hex (grün)
VCHR15A	Chr. 15	8,11 cM	Hex (grün)

Anhang

Tabelle A 4: Bonitur der Triebhaltung und SSR-Analysen in einer 0-1-Matrix für ‘Spätburgunder Clevner’ und ‘Spätburgunder FR 52-78’

Rebsorte u. Pflanze	OIV 006	VviTAC1		VviLAZY1		Rebsorte u. Pflanze	OIV 006	VviTAC1		VviLAZY1	
		Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2			Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
Elter ‘Spätburgunder Clevner’	3	1	1	1	1	Elter ‘Spätburgunder FR 52-78’	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 1	5	1	1	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 1	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 2	7	1	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 2	5	1	0	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 3	3	0	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 4	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 4	5	0	1	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 5	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 5	1	1	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 6	3	1	0	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 6	1	1	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 7	3	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 7	3	-	-	-	-	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 9	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 8	7	1	0	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 10	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 9	1	1	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 11	5	1	0	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 10	3	0	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 12	3	0	1	1	0
‘Spätburgunder Clevner’ - 11	3	0	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 13	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 12	3	1	1	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 14	5	1	1	1	0
‘Spätburgunder Clevner’ - 13	3	1	0	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 15	5	0	1	0	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 14	3	1	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 16	5	0	1	1	0
‘Spätburgunder Clevner’ - 15	5	1	0	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 17	3	1	1	0	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 16	5	1	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 18	3	1	1	1	0
‘Spätburgunder Clevner’ - 17	1	1	0	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 19	3	1	1	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 18	1	0	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 20	5	1	0	0	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 19	3	0	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 21	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 20	3	1	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 22	3	0	1	0	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 21	3	-	-	-	-	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 23	5	1	1	0	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 22	1	0	1	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 24	5	1	1	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 23	7	1	1	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 25	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 24	5	1	0	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 26	3	0	1	1	0
‘Spätburgunder Clevner’ - 25	3	0	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 28	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 26	1	1	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 29	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 27	1	1	0	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 30	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 28	3	1	1	-	-	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 31	3	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 29	5	1	0	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 32	5	1	0	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 30	1	0	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 34	5	0	1	1	0
‘Spätburgunder Clevner’ - 31	1	1	1	0	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 35	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 32	3	0	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 36	3	1	1	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 33	3	1	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 37	3	0	1	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 34	5	-	-	-	-	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 38	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 36	5	1	1	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 39	5	1	1	1	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 37	5	1	1	1	0	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 40	7	1	0	0	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 38	3	0	1	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 41	5	1	0	0	1
‘Spätburgunder Clevner’ - 39	3	1	0	1	1	‘Spätburgunder FR 52-78’ - 42	5	-	-	-	-
‘Spätburgunder Clevner’ - 40	1	1	1	1	1						
‘Spätburgunder Clevner’ - 41	1	1	1	-	-						
‘Spätburgunder Clevner’ - 43	1	0	1	1	1						

Anhang

Tabelle A 5: Bonitur der Triebhaltung und SSR-Analysen in einer 0-1-Matrix für 'Trollinger WE 4-7' und 'Trollinger S1'

Rebsorte u. Pflanze	OIV 006	VviTAC1		VviLAZY1		Rebsorte u. Pflanze	OIV 006	VviTAC1		VviLAZY1	
		Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2			Allel 1	Allel 2	Allel 1	Allel 2
Elter 'Trollinger WE 4-7'	5	1	1	1	1	Elter 'Trollinger S1'	3	1	1	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 1	3	1	1	1	1	'Trollinger S1' - 1	3	0	1	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 2	3	0	1	1	0	'Trollinger S1' - 2	3	1	0	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 3	3	1	1	1	0	'Trollinger S1' - 3	5	1	0	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 4	5	0	1	1	0	'Trollinger S1' - 4	3	1	0	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 5	5	1	0	1	0	'Trollinger S1' - 5	5	1	0	1	0
'Trollinger WE 4-7' - 6	3	0	1	1	1	'Trollinger S1' - 6	5	1	1	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 7	7	1	1	1	1	'Trollinger S1' - 7	5	1	0	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 8	5	1	1	1	1	'Trollinger S1' - 8	1	-	-	-	-
'Trollinger WE 4-7' - 9	3	1	1	1	0	'Trollinger S1' - 9	3	1	0	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 10	7	1	1	1	1	'Trollinger S1' - 10	3	1	1	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 11	7	0	1	1	1	'Trollinger S1' - 11	5	1	1	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 12	5	0	1	0	1	'Trollinger S1' - 12	1	1	1	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 13	7	1	0	0	1	'Trollinger S1' - 13	5	1	0	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 14	7	0	1	1	1	'Trollinger S1' - 14	7	-	-	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 15	7	1	1	1	0	'Trollinger S1' - 15	5	0	1	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 16	5	1	1	1	0	'Trollinger S1' - 16	5	1	0	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 17	5	1	1	-	-	'Trollinger S1' - 17	5	1	1	1	0
'Trollinger WE 4-7' - 18	3	-	-	-	-	'Trollinger S1' - 18	3	1	1	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 19	7	1	1	0	1	'Trollinger S1' - 19	3	1	1	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 20	7	0	1	1	0	'Trollinger S1' - 20	5	1	0	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 21	3	1	1	0	1	'Trollinger S1' - 21	3	1	0	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 22	5	1	0	1	1	'Trollinger S1' - 23	3	1	1	1	0
'Trollinger WE 4-7' - 23	3	1	1	0	1	'Trollinger S1' - 24	3	1	0	1	1
'Trollinger WE 4-7' - 24	5	1	0	1	0	'Trollinger S1' - 25	3	1	1	0	1
'Trollinger WE 4-7' - 25	3	1	1	-	-	'Trollinger S1' - 26	3	1	0	1	1
						'Trollinger S1' - 27	3	0	1	1	0

Tabelle A 6: Identifizierte Promotorelemente bei der Weinrebe für *VviTAC1* und *VviLAZY1* (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>)

Promotor <i>VviTAC1</i>		
Zusammenhang Promotorelement	Promotorelement	Anzahl Elemente
Amylase	AMYBOX2, POLASIG1, POLASIG2, TGACGTVMAMY, TATCCAYMOTIFOSRAMY3D, TATCCAOSAMY, WBOXHVISO1, PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	8
Zucker-Antwort	SREATMSD	1
Licht-Regulierung	ASF1MOTIFCAMV, GATABOX, GT1MOTIFPSRBCS, CCA1ATLHCB1, GT1CONSENSUS, IBOXCORE, REALPHALGLHCB21, -10PEHVPSBD, INRNTPSADB, SORLIP1AT, SORLIP2AT	11
circadiane Rhythmik	CIACADIANLELHC	1
Wasserstress	MYBCORE, MYB2AT, MYCATRD22, MYCCONSENSUSAT, MYB1AT, MYB2CONSENSUSAT, MYCATERD1, ABRELATERD1, ACGTATERD1	9
Ethylen-Antwort	ERELEE4	1
Gibberellin	WRKY71OS	1
Auxin	ASF1MOTIFCAMV, ARFAT, NTBBF1ARROLB, CATATGGMSAUR	4
Salicylsäure	ASF1MOTIFCAMV, WBOXATNPR1	2
Expression in Blüte	CCAATBOX1	1
Expression in Samen	RYREPEATLEGUMINBOX, PROXBBNNAPA, RYREPEATBNNAPA	3
Expression Embryo und Endosperm	CANBNNAPA	1
Expression in Wurzel, Internodien, Wurzel	NRRBNEXTA	1
Expression in Pollen	POLLEN1LELAT52, GTGANTG10	2
Expression in Frucht	TGTCACACMCUCUMISIN	1
Expression Mesophyll	CACTFTPPCA1	1
Promotor <i>VviLAZY1</i>		
Amylase	POLASIG1, AMYBOX1, SP8BFIBSP8BIB, WBOXHVISO1	4
Zucker-Antwort	SREATMSD	1
Licht-Regulierung	GATABOX, GT1CONSENSUS, IBOXCORE, PALBOXAPC, REALPHALGLHCB21, -10PEHVPSBD, INRNTPSADB, IBOX, SORLIP1AT, SORLIP2AT, TBOXATGAPB, IBOXCORENT,	12
circadiane Rhythmik	CIACADIANLELHC	1
Wasserstress	MYBCORE, MYB2AT, MYCATRD22, MYCCONSENSUSAT, MYB2CONSENSUSAT, MYCATERD1	6
Gibberellin	WRKY71OS, GAREAT, PYRIMIDINEBOXOSRAMY1A	3
Auxin	ARFAT, NTBBF1ARROLB	2
Abscisinsäure	RYREPEATBNNAPA	1
Salicylsäure	WBOXATNPR1	1
Cytokinin	CPBCSPOR	1
Expression in Blüte	CCAATBOX1	1
Expression in Samen	RYREPEATLEGUMINBOX, RYREPEATBNNAPA	2
Expression in Embryo und Endosperm	CANBNNAPA, DPBFCOREDCDC3	2
Expression in Pollen	POLLEN1LELAT52, GTGANTG10, QELEMENTZMZM13	3
Expression in Frucht	TGTCACACMCUCUMISIN	1
Expression Mesophyll	CACTFTPPCA1	1

Anhang

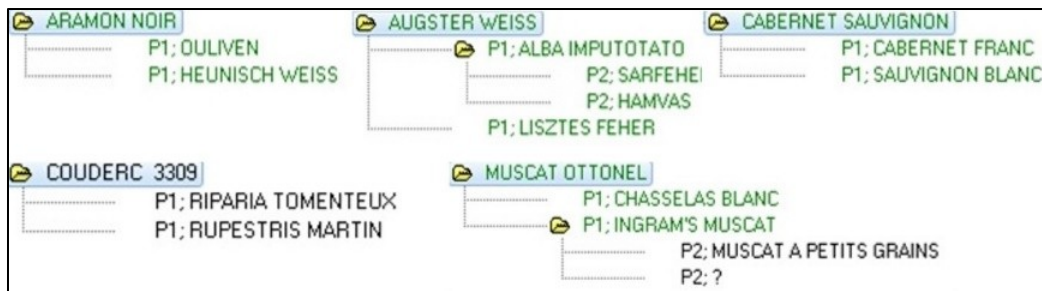


Abbildung A 1: Stammbaum von 'Aramon Noir', 'Augster Weiss', 'Cabernet Sauvignon', 'Couderc 3309' und 'Muscat Ottoneil'

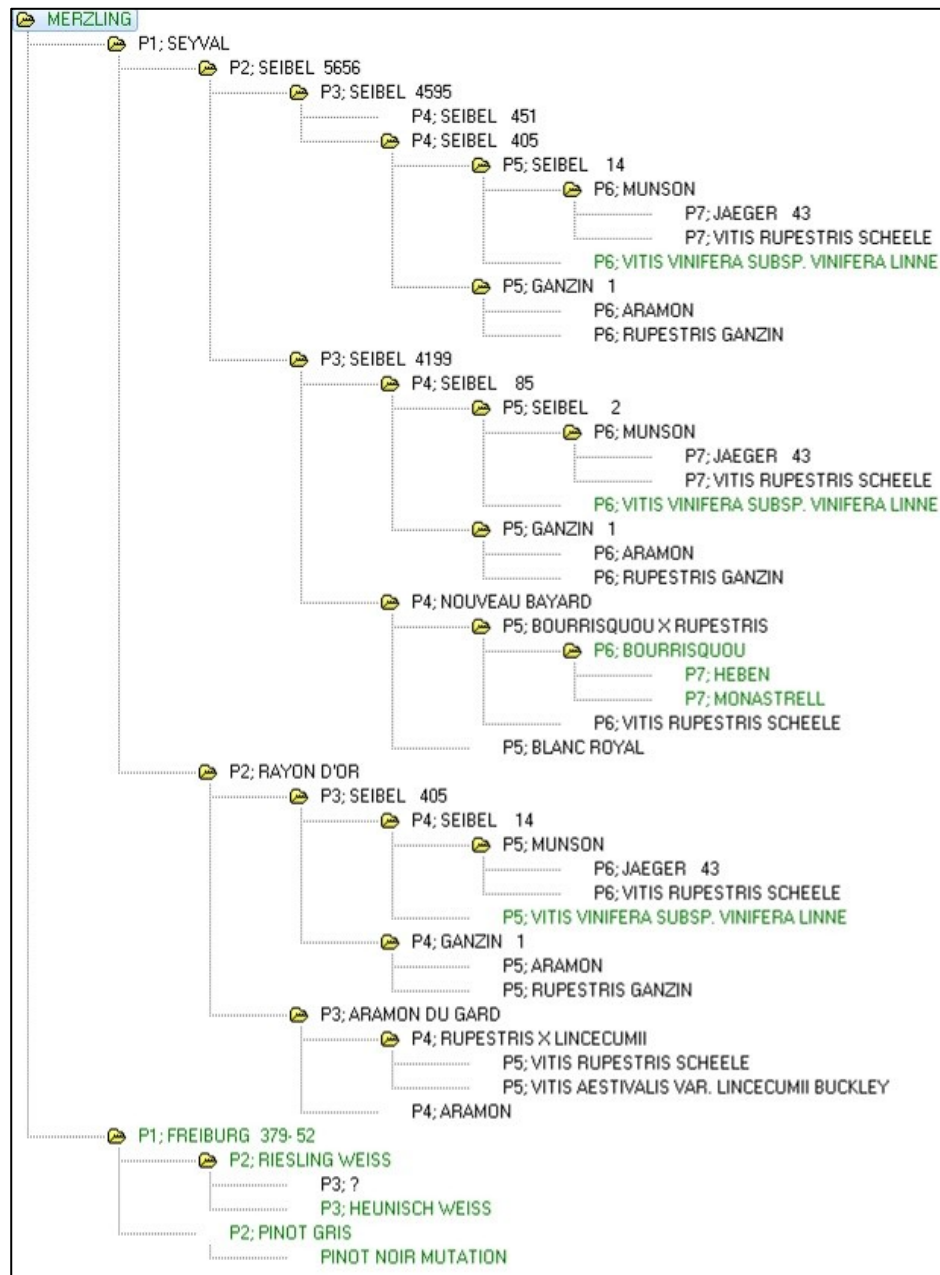


Abbildung A 2: Stammbaum von 'Merzling'

Anhang

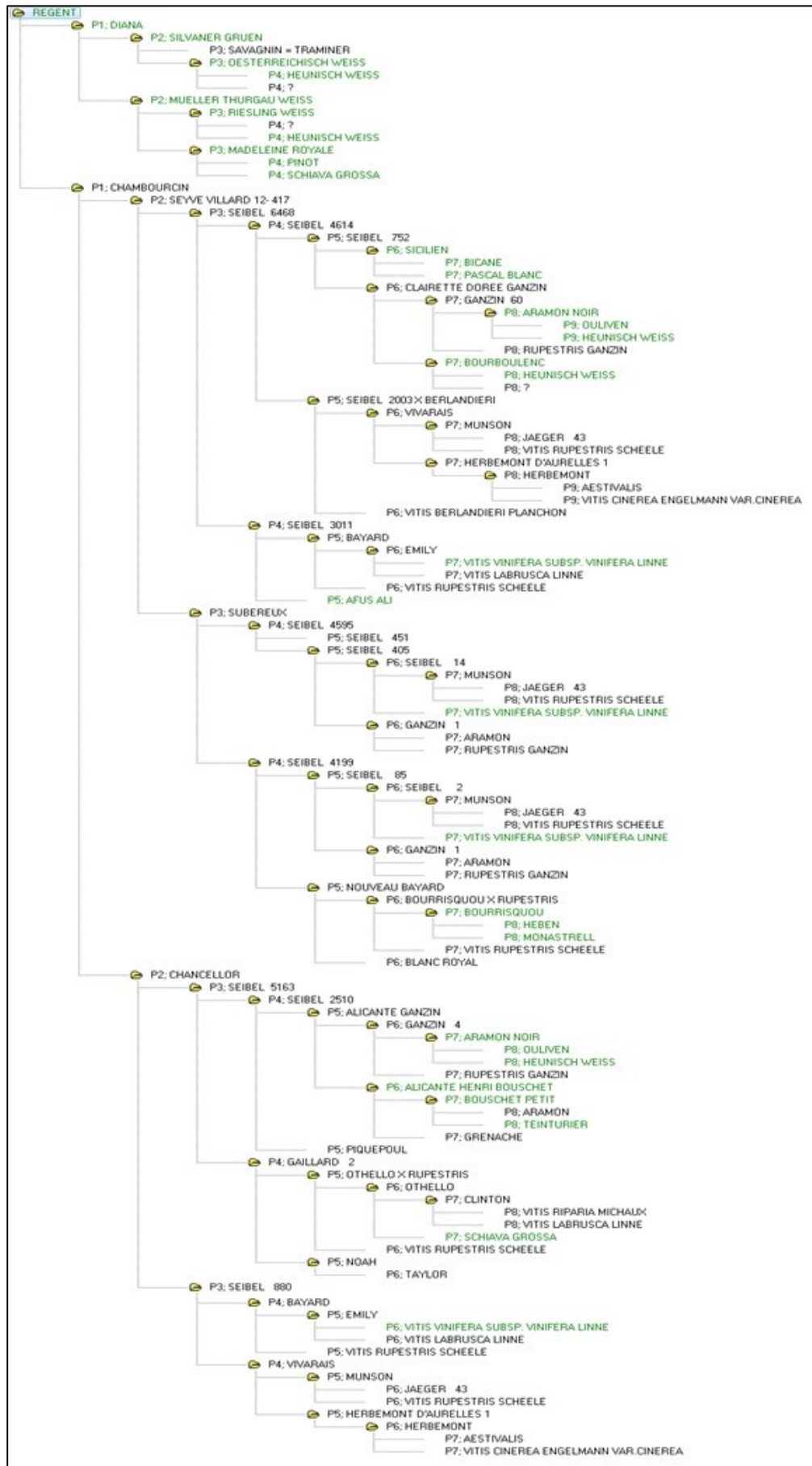


Abbildung A 3: Stammbaum von 'Regent'

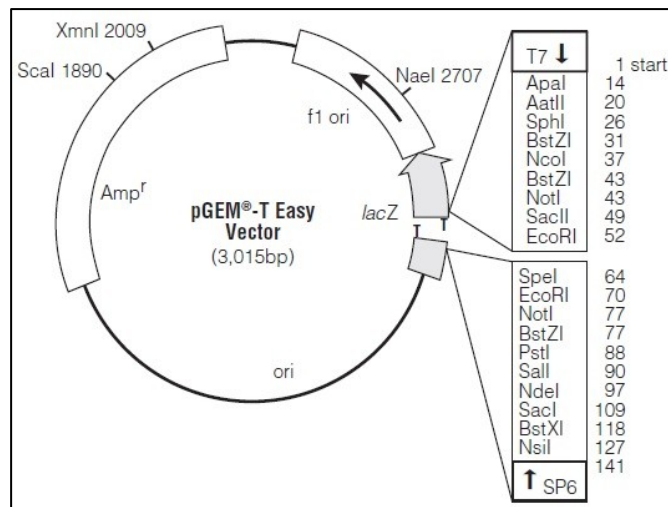


Abbildung A 4: pGEM®-T Easy Vector System (Mannheim, Promega GmbH)
<https://www.promega.de/products/pcr/pcr-cloning/pgem-t-easy-vector-systems/?catNum=A1360>

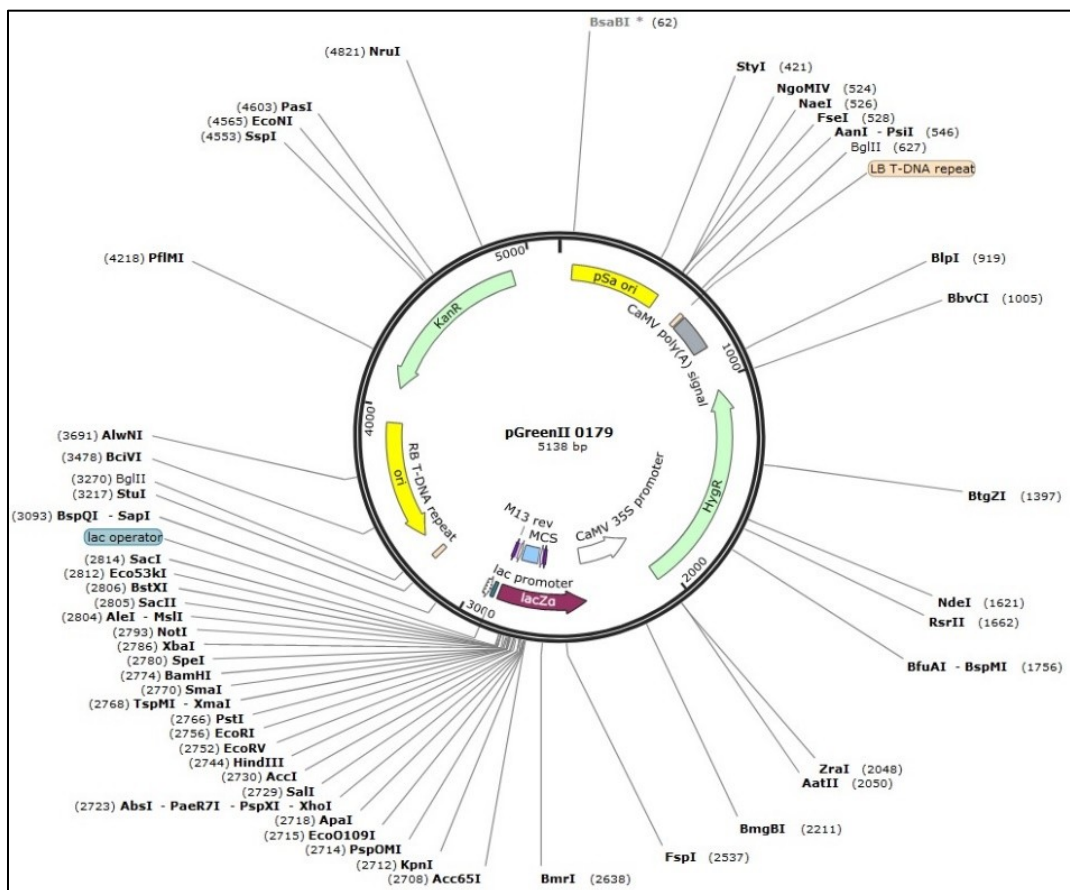


Abbildung A 5: Vektorkarte pGreenII 0179 (https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pGreenII_0179)

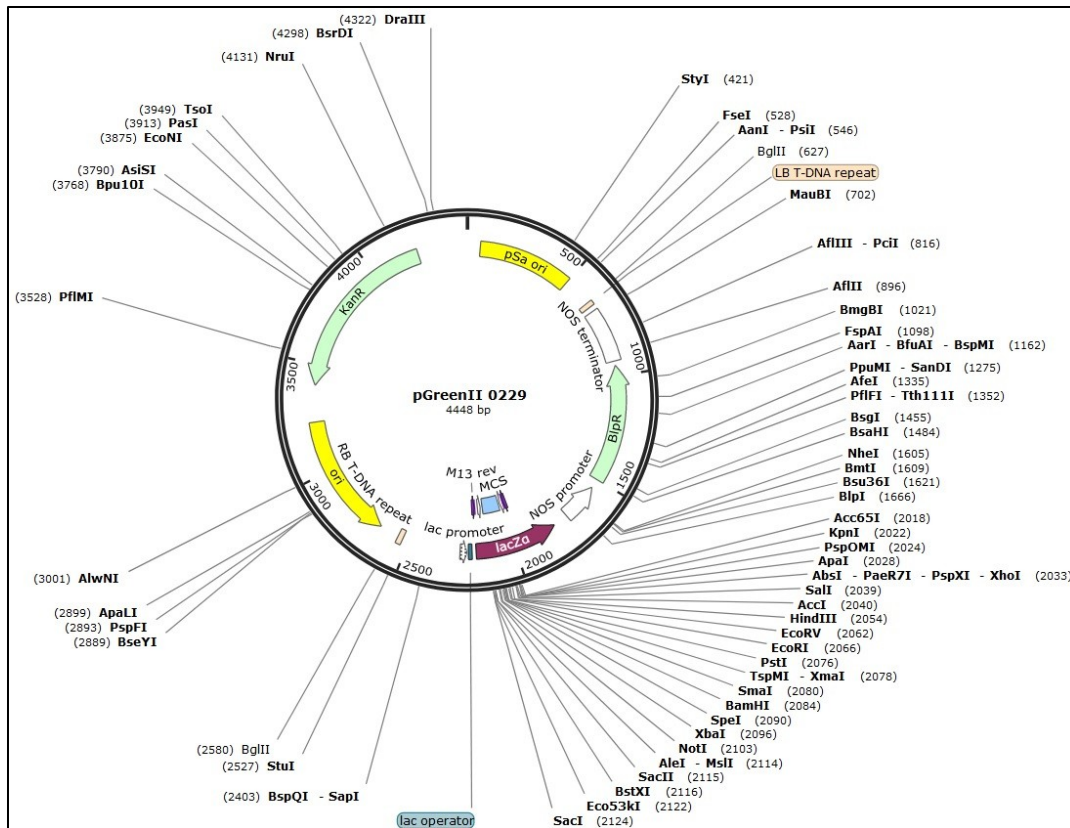


Abbildung A 6: Vektorkarte pGreenII 0229 (https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pGreenII_0229)

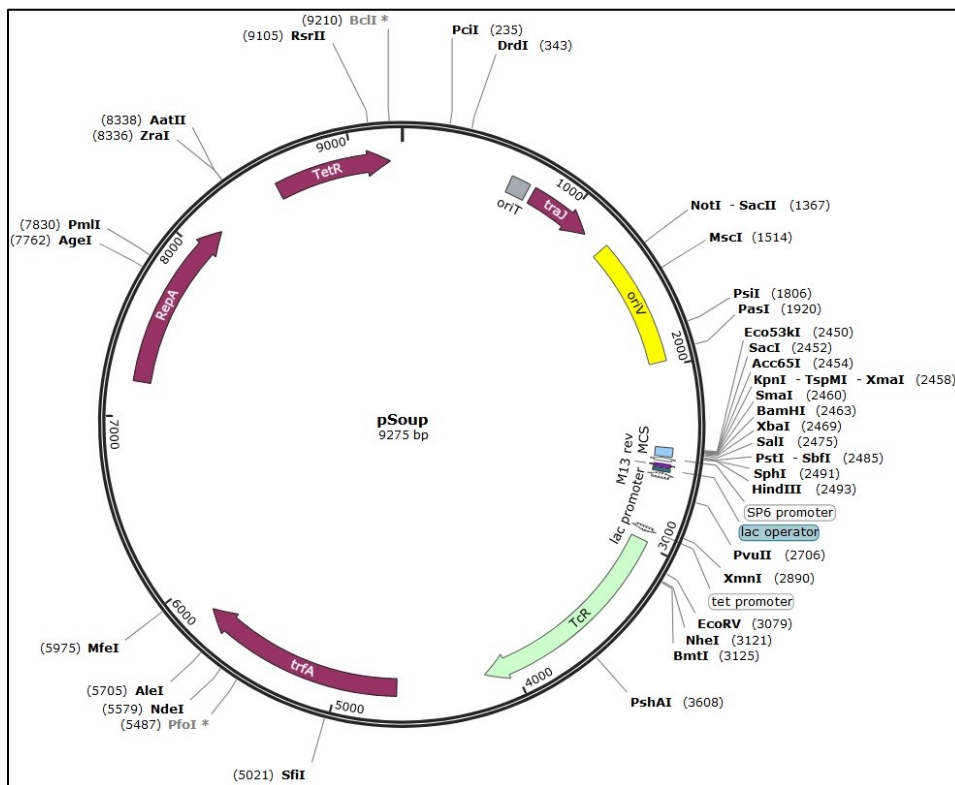


Abbildung A 7: Vektorkarte pSOUP (https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pSOUP)

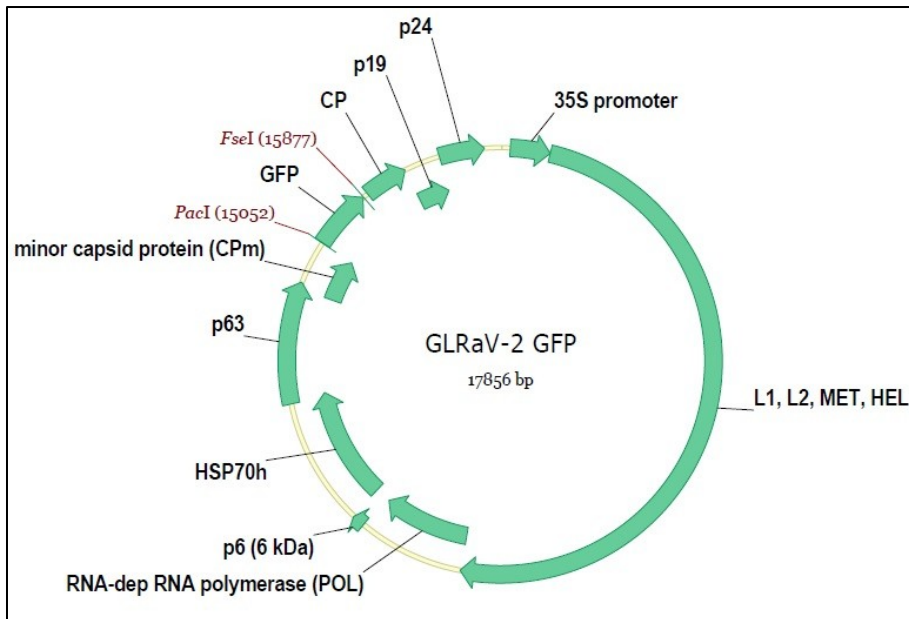


Abbildung A 8: GLRaV-2-Konstrukt

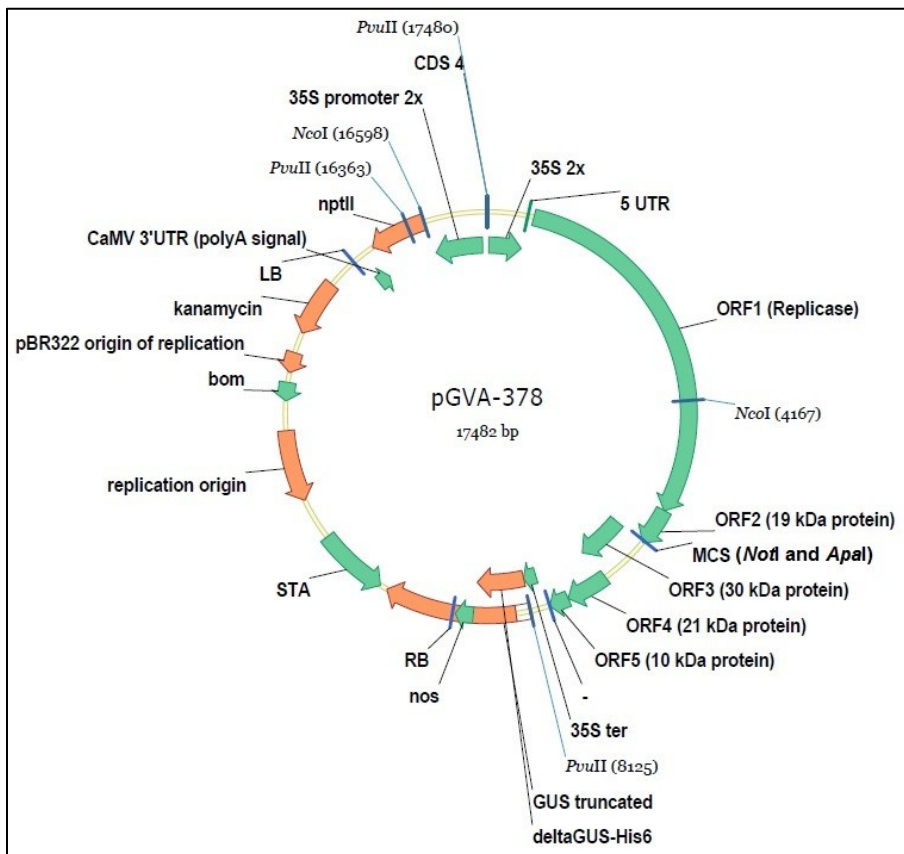


Abbildung A 9: GVA-Konstrukt

VviTAC1 (GSVIVG01027402001)

MKIFNWVHRRFNHNVHSTPISLQKDGLAANLKKVESITNDTDTQALLKHVALVDMLDGWKD
GILAI GTLGFD DPLYSFSSSEKECAMTDEEEGEDEEEEEEVYSLNNENGEVEDEDEDETEVN
PLVFSAFGDNVPKPIPIMTVDGVPLSRFVGSSHEVGIESFTTENDQRKSKGERTTLADLFS
ADSEVRAKVDP EGLKVD SGKKPAPRSKNGLSFAKKLI PRVGEDSRPIKKLHQLMTRMLKRK
IHPELEGKIQKPEDQIKASTAVGGLATVGN GAIESVSL LQTQDATMV

Abbildung A 10: Aminosäureabfolge für VviTAC1 (GSVIVG01027402001)

VviLAZY1 (GSVIVG01010528001)

MKLLGWMHRKFRQNSSEPLKDF AIGQRSLDDQYYPKSNYGTKPLRQRDYYLRKSFAGLEA
AREEEEDDFEEESSAAISELFHGFLAIGTLGSDPVVNDPSTPTFAISVENITEKETEV TEN
ELKLINDELEKVLGA EAKEDGYSSGRNSHVSTGRSSHGSTITLSGKPMEGTESNGNGTTVC
PLQGYLFGSAIELPETTTVAKKEHRTSLGELFQRSKEENSGAKCERGEKRTDKEADKSAVH
IMKKMLKKKMLHASSRNSTAAGGTVD SASAETKLHKILHMFHRKVHPESSTATEKPNRPHK
NEIKNGIFYDGGC NNGDRMLPDEDIMIFPQRTLSKESIRRYKSQSNPPQFTLCGND SNGNR
EYWIKTADADYLVLEL

Abbildung A 11: Aminosäureabfolge für VviLAZY1 (GSVIVG01010528001)



Abbildung A 12: Bonitur der 13 Referenzsorten im Jahr 2017 nach 13 Wochen Wachstum, A: 'Augster', B: 'Cabernet Sauvignon', C: 'Merzling', D: 'Monastrell', E: 'Garnacha Tinta', F: 'Muscat Ottonel', G: 'Sauvignon Blanc', H: 'Barbera', I: 'Regent', J: 'Vermentino', K: 'Aramon', L: 'Dattier de Beyrouth', M: 'Couderc 3309'



Abbildung A 13: Bonitur der 13 Referenzsorten im Jahr 2016 nach 13 Wochen Wachstum, A: 'Augster', B: 'Cabernet Sauvignon', C: 'Monastrell', D: 'Garnacha Tinta', E: 'Muscat Ottonel', F: 'Sauvignon Blanc', G: 'Barbera', H: 'Vermentino', I: 'Dattier de Beyrouth', J: 'Aramon', K: 'Merzling', L: 'Regent', M: 'Couderc 3309'



Abbildung A 14: Bonitur der 13 Referenzrebsorten im Jahr 2015 nach 15 Wochen Wachstum, A: 'Aramon', B: 'Augster', C: 'Barbera', D: 'Carbernet Sauvignon', E: 'Regent', F: 'Dattier de Beyrouth', G: 'Garnacha Tinta', H: 'Monastrell', I: 'Muscat Ottonel', J: 'Merzling', K: 'Sauvignon Blanc', L: 'Vermentino', M: 'Couderc 3309'

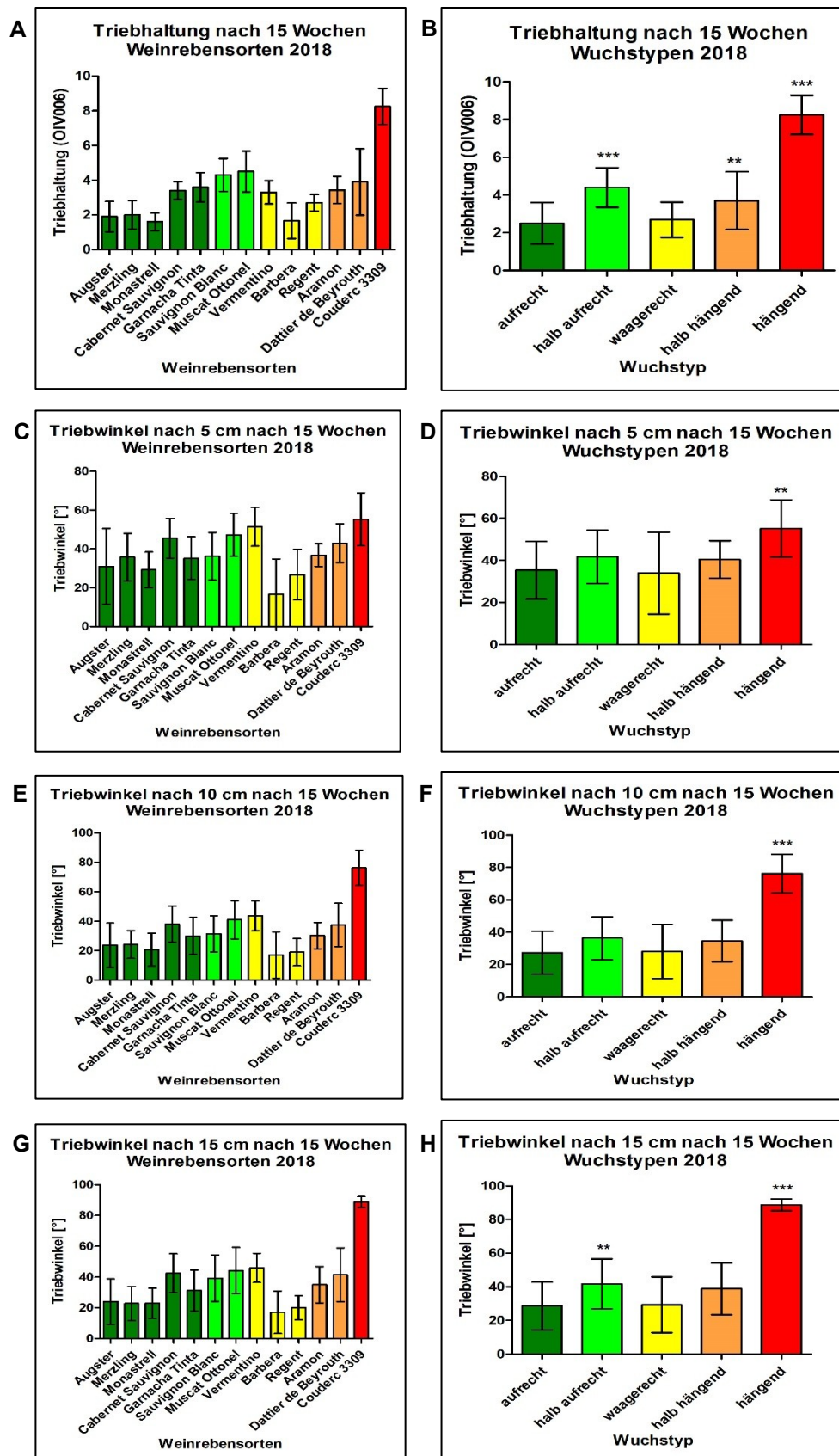


Abbildung A 15: Bonitur der Merkmale Triebhaltung, Triebwinkel nach 5, 10 sowie 15 cm Sprosslänge, Anzahl Internodien, Länge Internodien, Anzahl Verzweigungen, Sprossdurchmesser und Gesamtlänge Hauptspross in den Jahren 2017 und 2018 nach 15 Wochen, A= Triebhaltung (Wuchstyp), B= Triebhaltung (Sorten), C= Triebwinkel nach 5 cm (Wuchstyp), D= Triebwinkel nach 5 cm (Sorten), E= Triebwinkel nach 10 cm (Wuchstyp), F= Triebwinkel nach 10 cm (Sorten), G= Triebwinkel nach 15 cm (Wuchstyp), H= Triebwinkel nach 15 cm (Sorten), * $p < 0,1$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

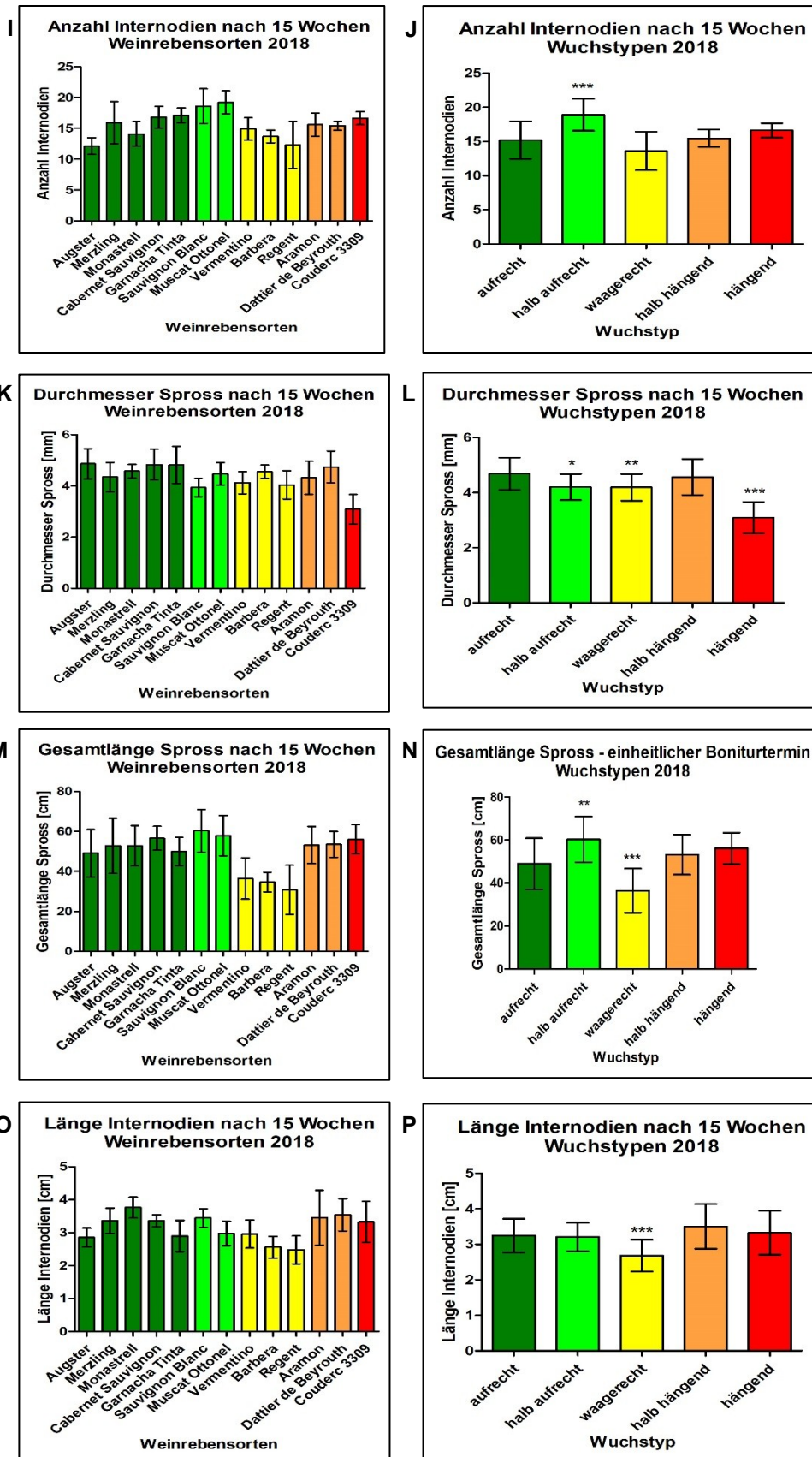


Abbildung A 15: Bonitur der Merkmale Triebhaltung, Triebwinkel nach 5, 10 sowie 15 cm Sprosslänge, Anzahl Internodien, Länge Internodien, Anzahl Verzweigungen, Sprossdurchmesser und Gesamtlänge Hauptspross in den Jahren 2017 und 2018 nach 15 Wochen, I= Anzahl Internodien (Wuchstyp), J= Anzahl Internodien (Sorten), K= Sprossdurchmesser (Wuchstyp), L= Sprossdurchmesser (Sorten), M= Gesamtlänge Spross (Wuchstyp), N= Gesamtlänge Spross (Sorten), O= Länge Internodien (Wuchstyp), P= Länge Internodien (Sorten), * p < 0,1, ** p < 0,01, *** p < 0,001

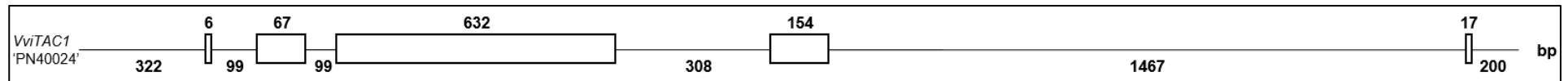


Abbildung A 16: Allgemeine Struktur von *VviTAC1* auf Grundlage des Referenzgenoms 'PN40024'

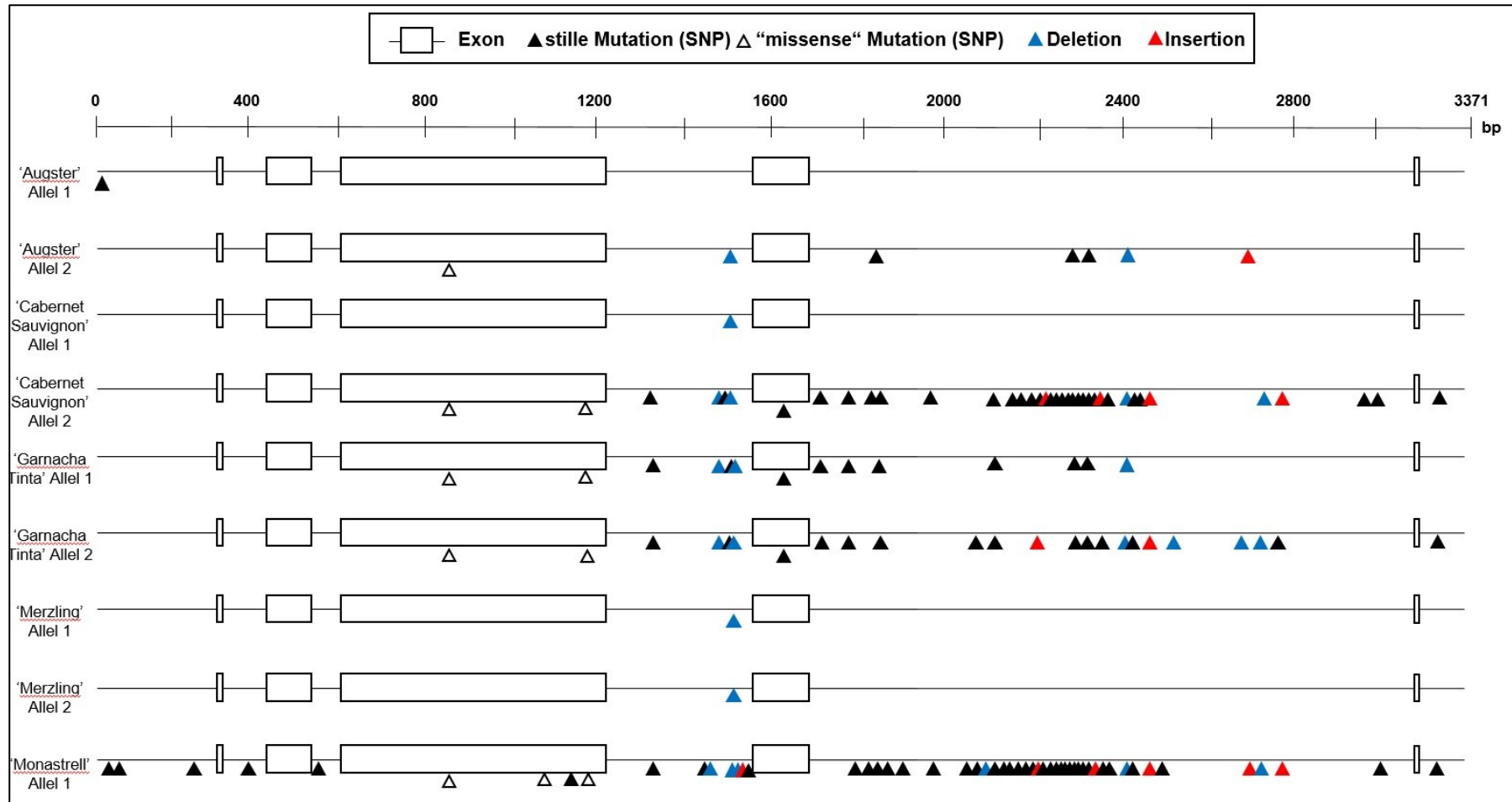


Abbildung A 17: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Augster', 'Cabernet Sauvignon', 'Garnacha Tinta', 'Merzling' und 'Monastrell' für *VviTAC1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'

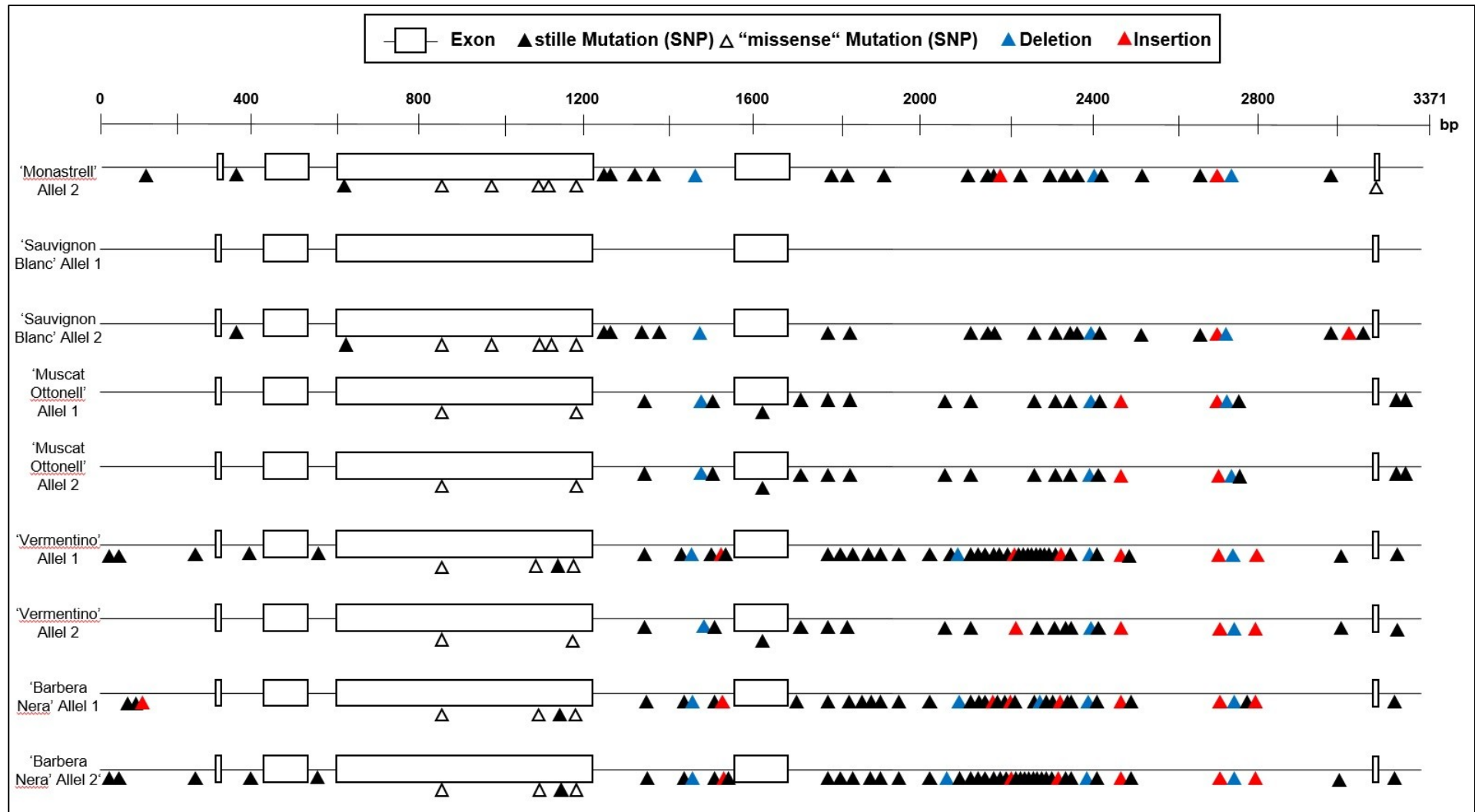


Abbildung A 18: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Monastrell', 'Sauvignon Blanc', 'Muscat Ottonell', 'Vermentino' und 'Barbera Nera' für *VviTAC1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'

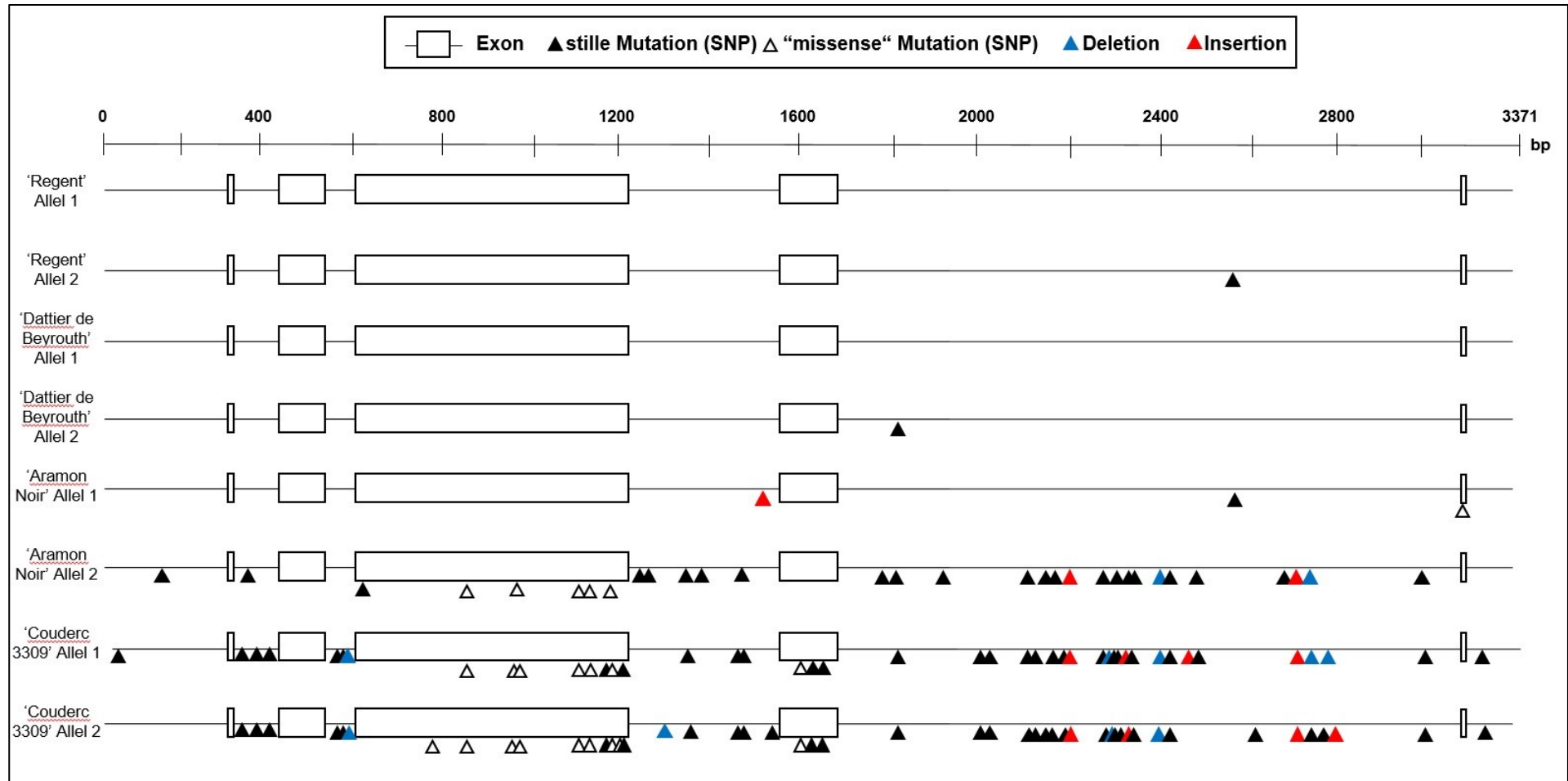


Abbildung A 19: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Regent', 'Dattier de Beyrouth', 'Aramon Noir' und 'Couderc 3309' für *VviTAC1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'



Abbildung A 21: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Augster', 'Cabernet Sauvignon', 'Garnacha Tinta', 'Merzling' und 'Monastrell' für *VviLAZY1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'



Abbildung A 21: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Augster', 'Cabernet Sauvignon', 'Garnacha Tinta', 'Merzling' und 'Monastrell' für *VviLAZY1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'

Anhang

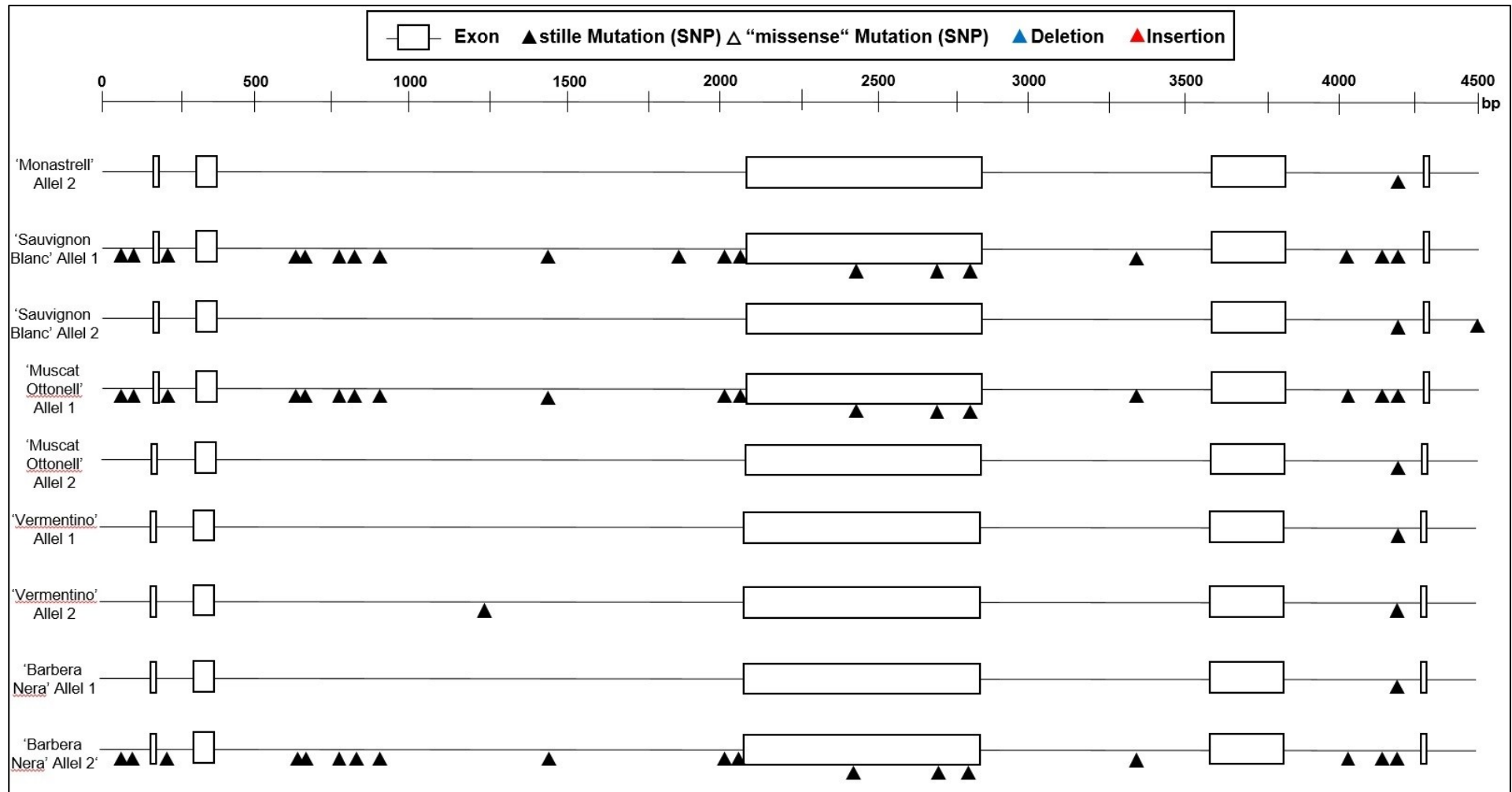


Abbildung A 22: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Monastrell', 'Savignon Blanc', 'Muscat Ottonell', 'Vermentino' und 'Barbera Nera' für *VviLAZY1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'

Anhang

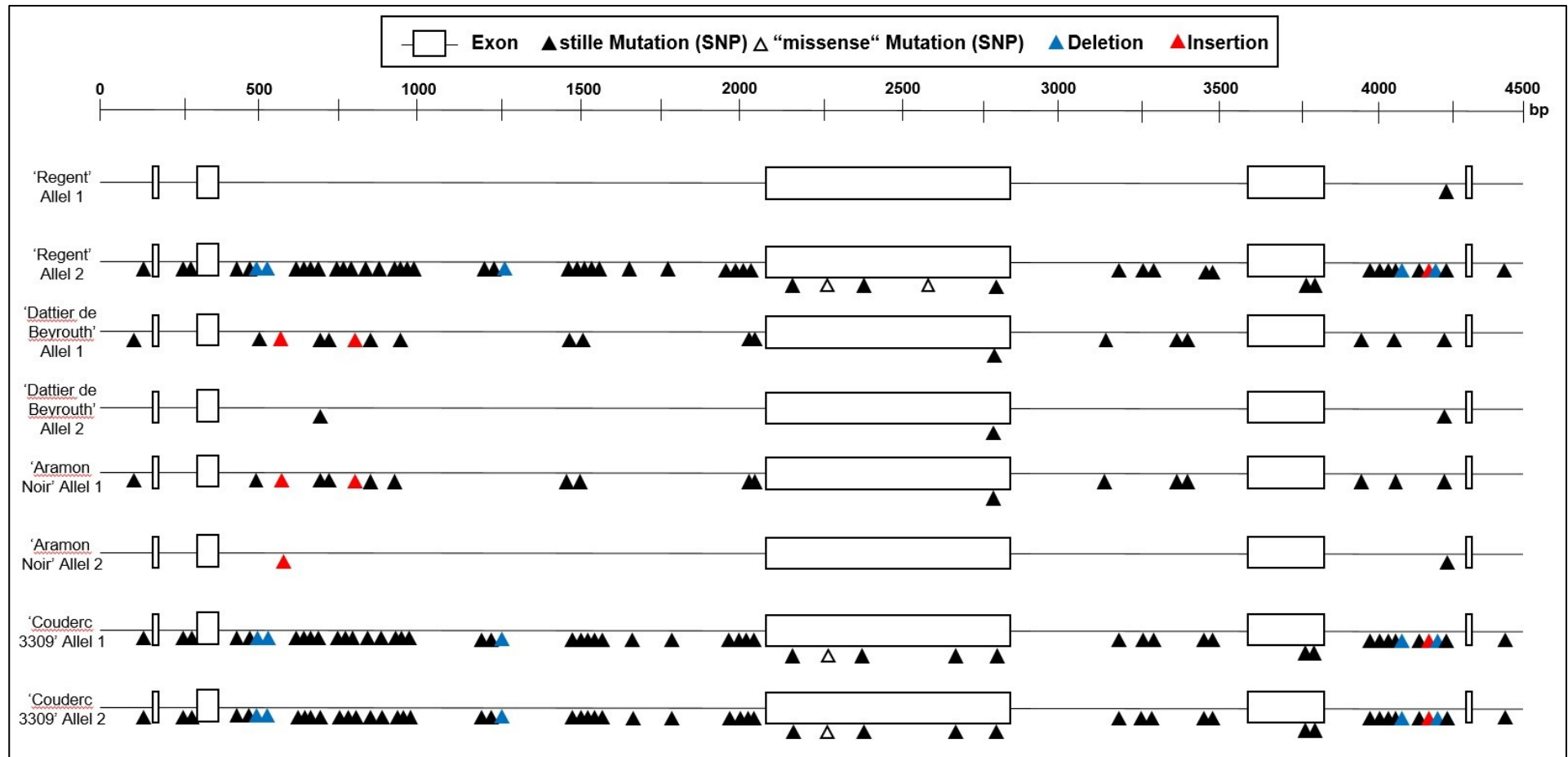


Abbildung A 23: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Regent', 'Dattier de Beyrouth', 'Aramon Noir' und 'Couderc 3309' für *VviLAZY1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'

Anhang

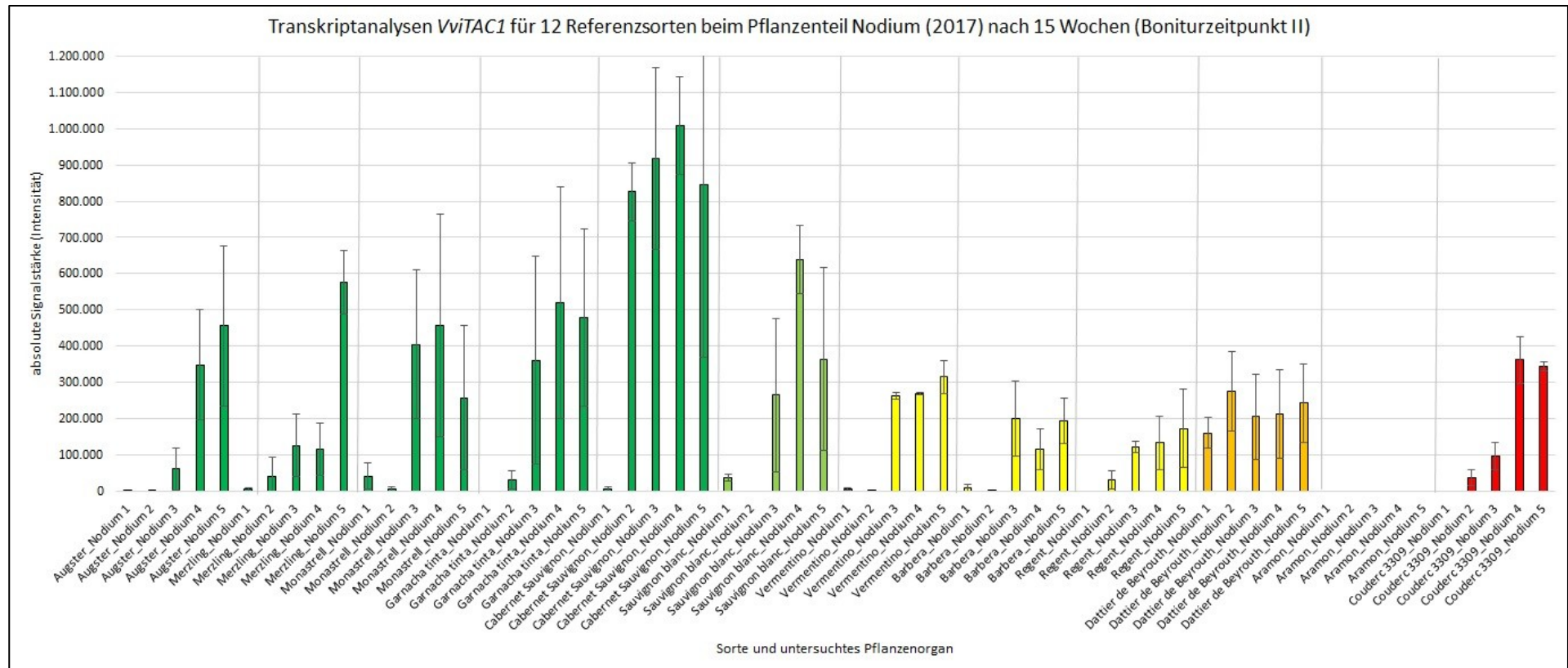


Abbildung A 24: Transkriptanalysen für *VviTAC1* bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Nodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II), grün = aufrechter Wuchstyp, hellgrün = halb aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

Anhang

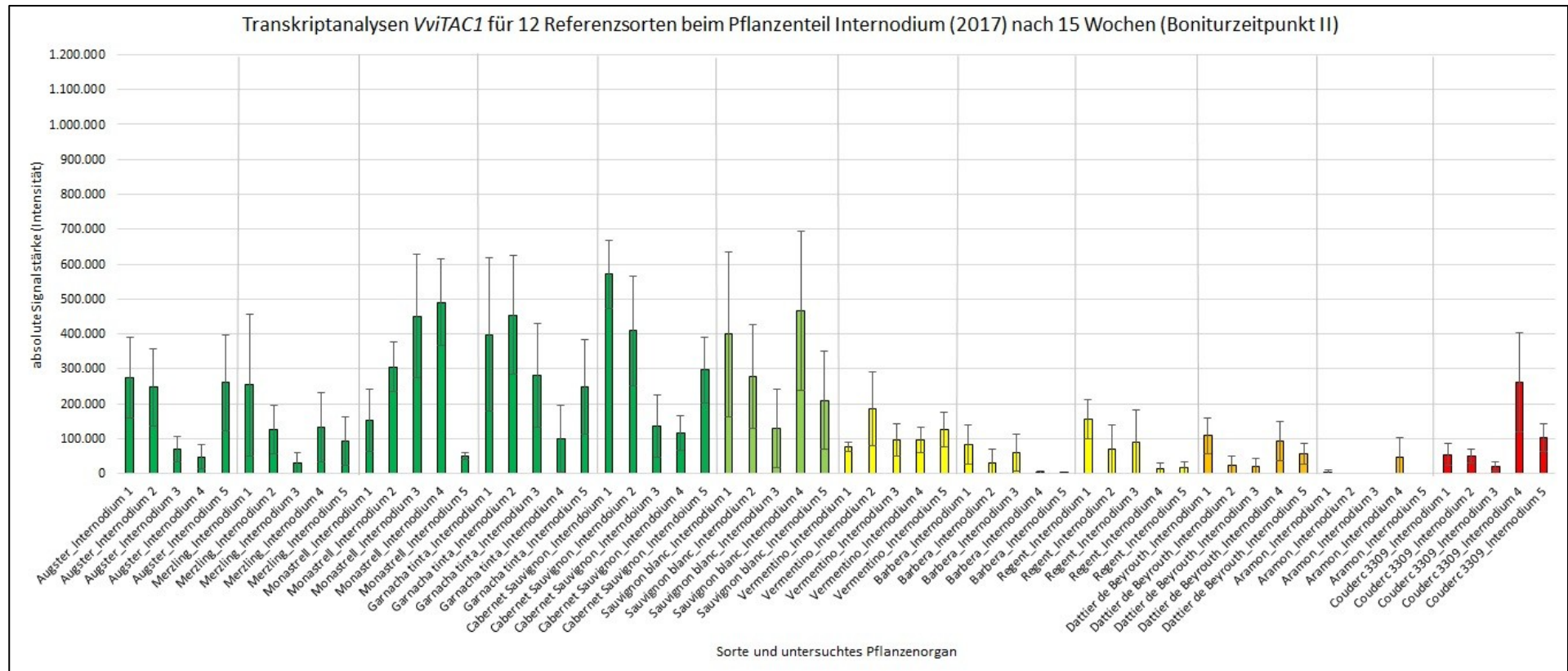


Abbildung A 25: Transkriptanalysen für *VviTAC1* bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Internodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II), grün = aufrechter Wuchstyp, hellgrün = halb aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

Anhang

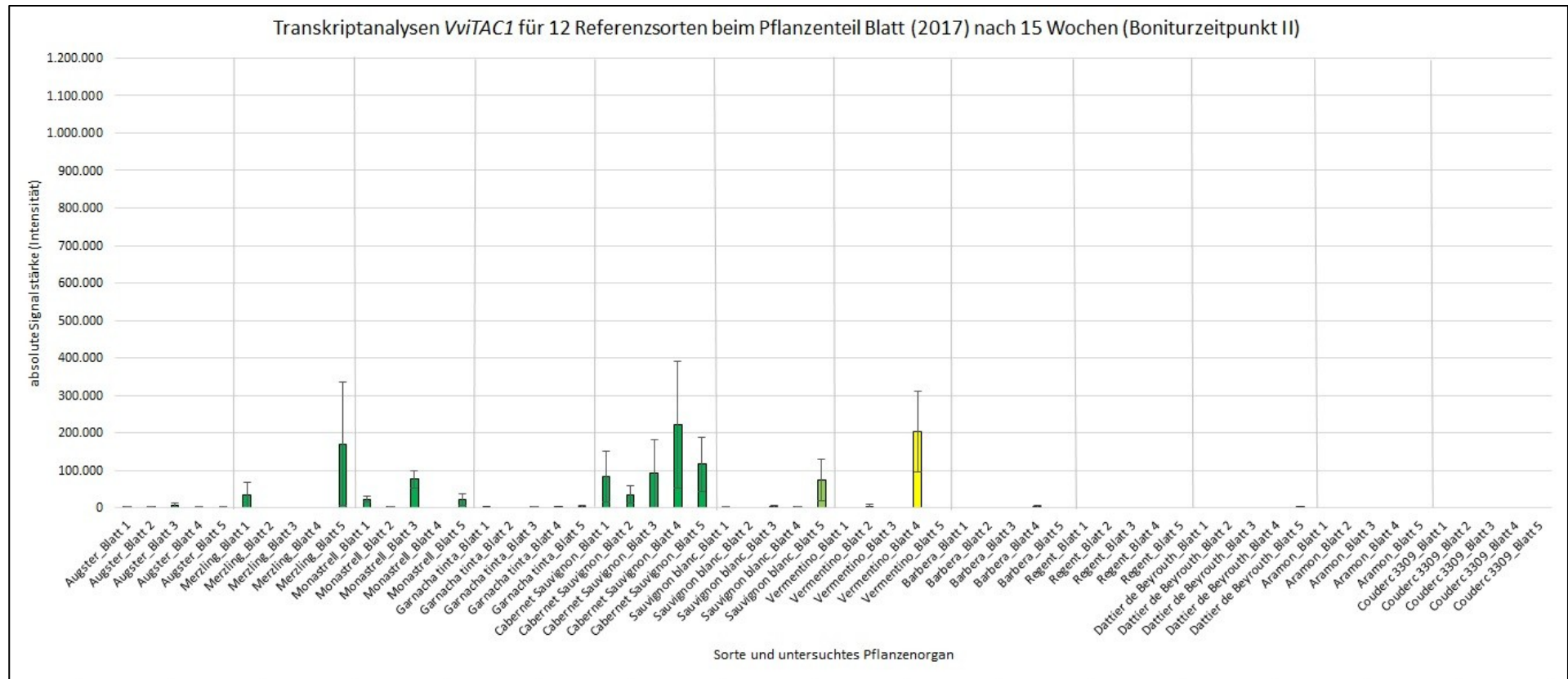


Abbildung A 26: Transkriptanalysen für *VviTAC1* bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Blatt nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II), grün = aufrechter Wuchstyp, hellgrün = halb aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

Anhang

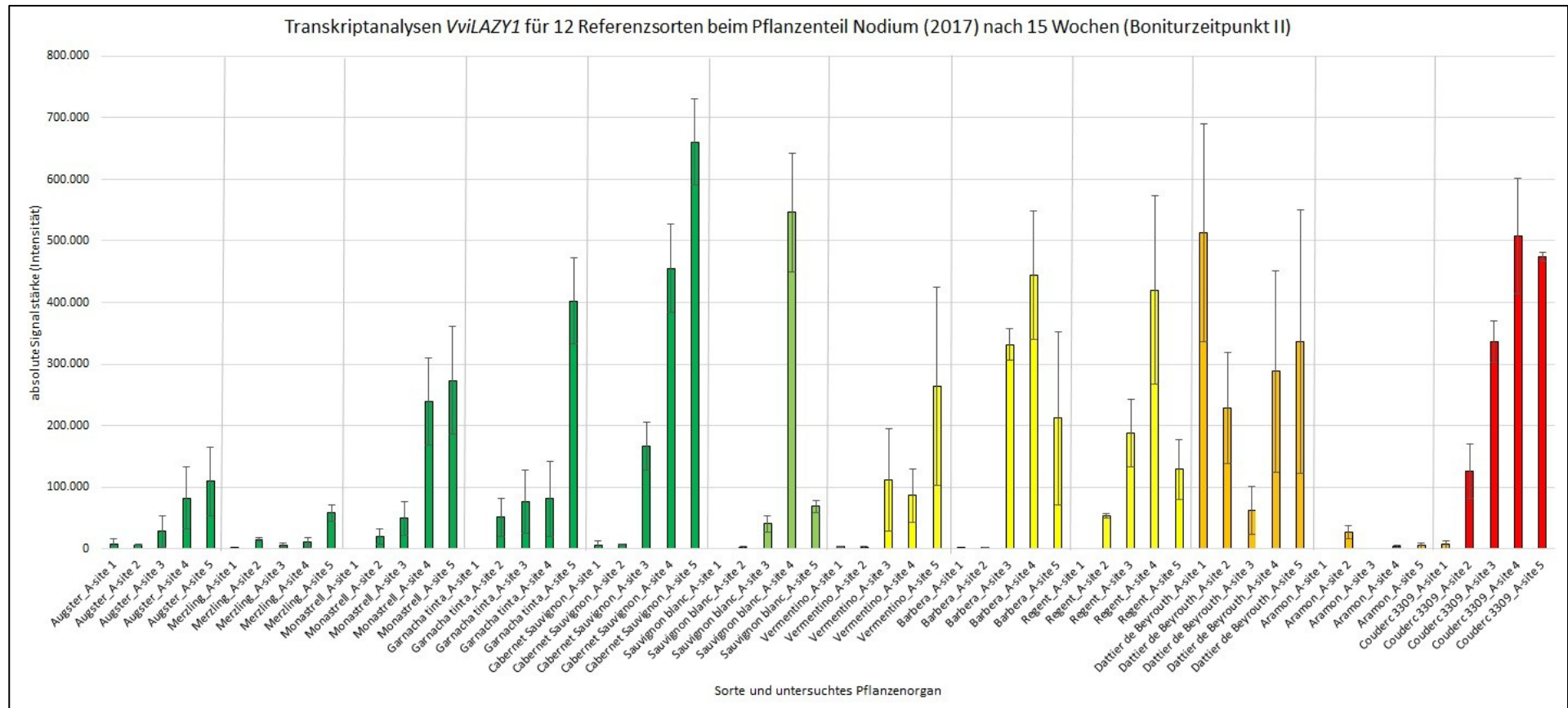


Abbildung A 27: Transkriptanalysen für *VviLAZY1* bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Nodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II), grün = aufrechter Wuchstyp, hellgrün = halb aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

Anhang

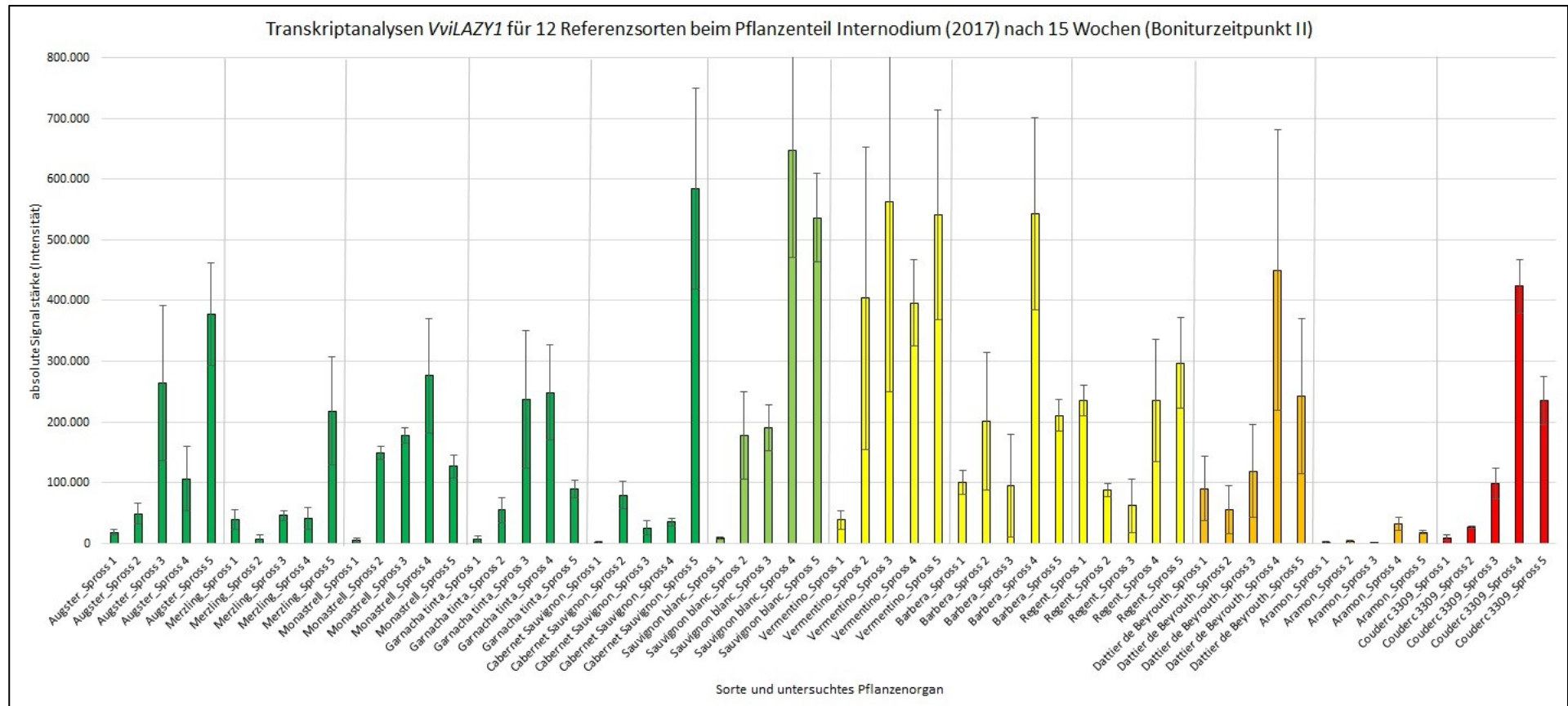


Abbildung A 28: Transkriptanalysen für *VviLAZY1* bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Internodium nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II), grün = aufrechter Wuchstyp, hellgrün = halb aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

Anhang

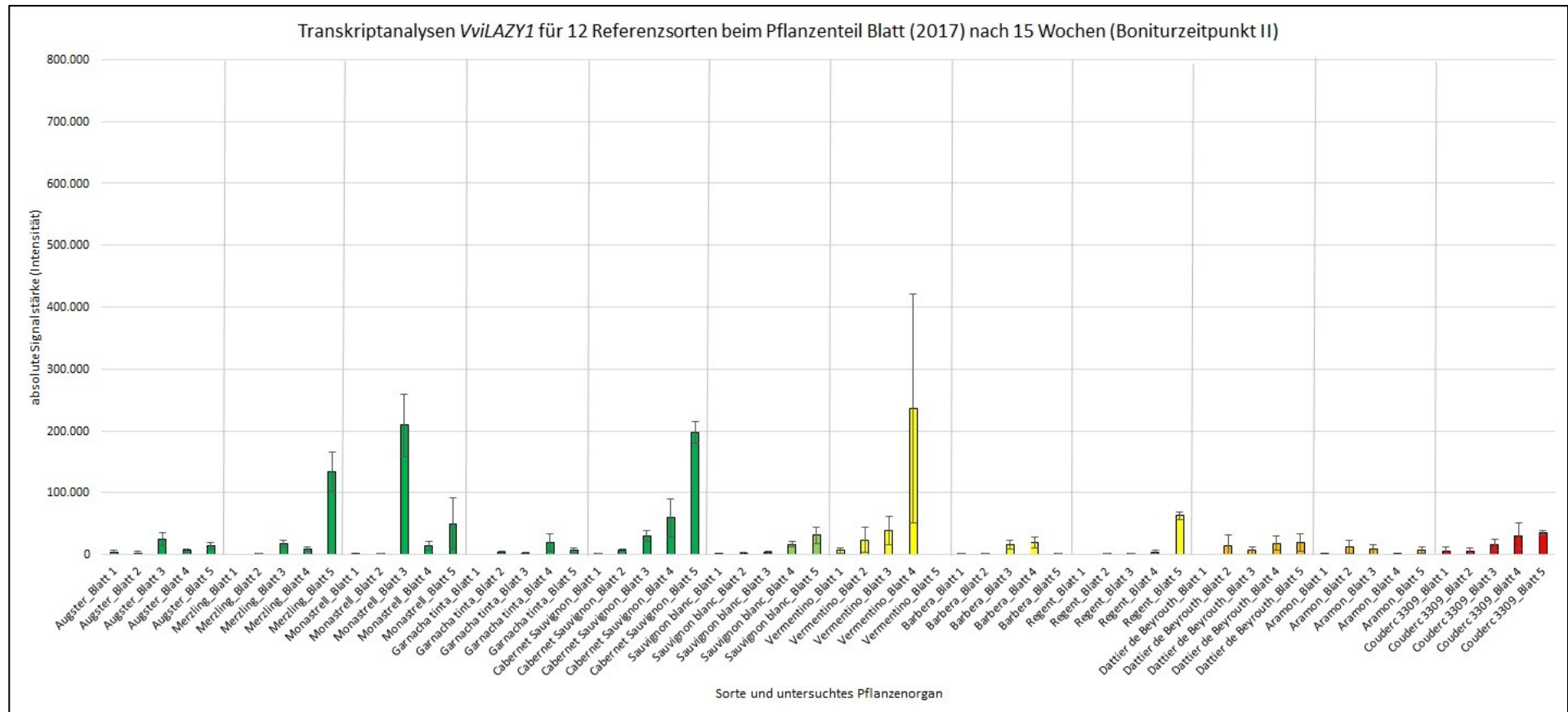


Abbildung A 29: Transkriptanalysen für *VviLAZY1* bei 12 Referenzsorten für das Pflanzenteil Blatt nach 15 Wochen (Boniturzeitpunkt II), grün = aufrechter Wuchstyp, hellgrün = halb aufrechter Wuchstyp, gelb = waagerechter Wuchstyp, orange = halb hängender Wuchstyp, rot = hängender Wuchstyp

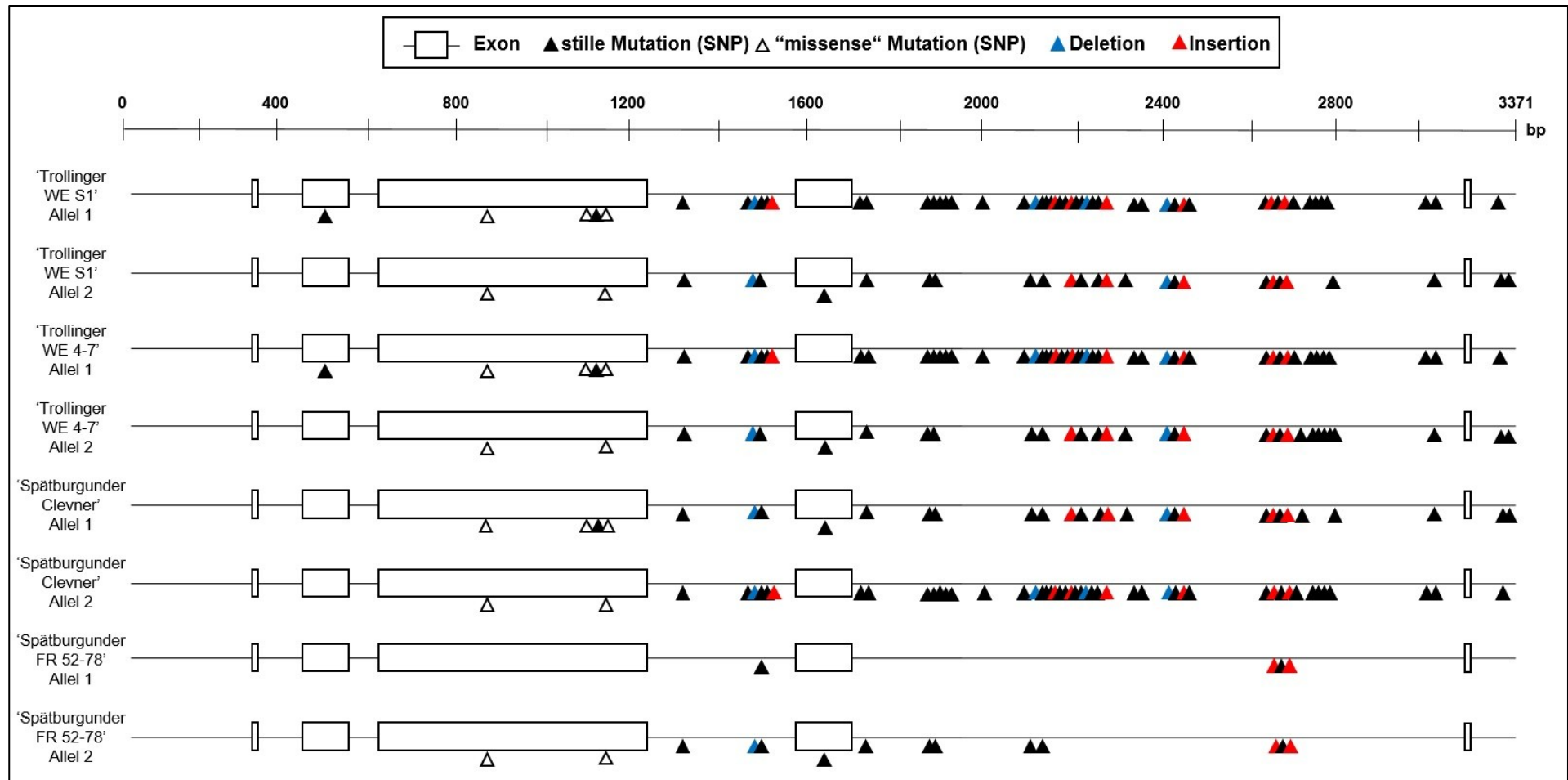


Abbildung A 30: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten ‘Trollinger WE S1’, ‘Trollinger WE 4-7’, ‘Spätburgunder Clevner’ und ‘Spätburgunder FR 52-78’ für *VviTAC1* im Vergleich zum Referenzgenom ‘PN40024’

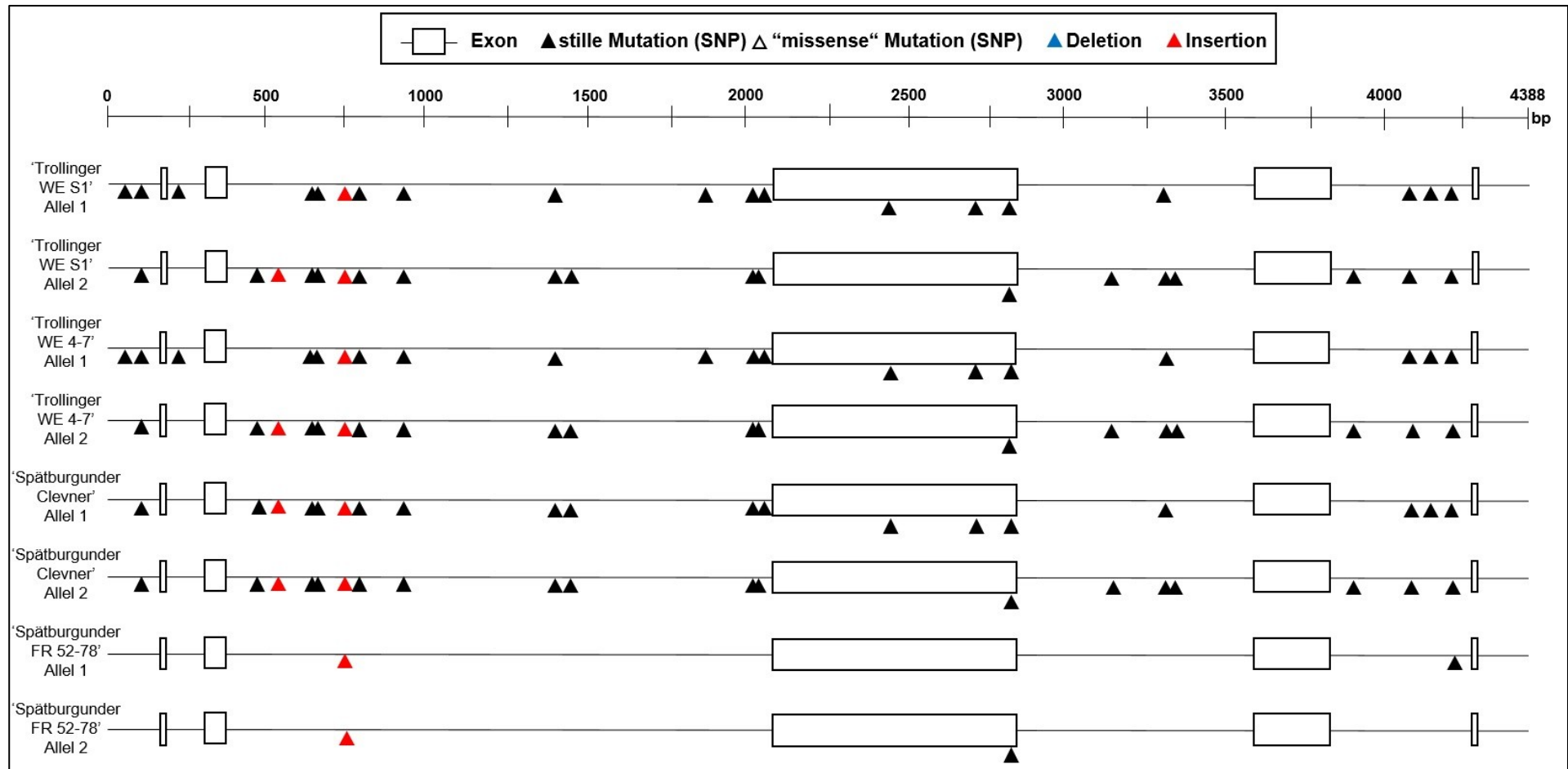


Abbildung A 31: Übersicht der genomischen Sequenzanalysen für SNP's, Deletionen und Insertionen bei den Sorten 'Trollinger WE S1', 'Trollinger WE 4-7', 'Spätburgunder Clevner' und 'Spätburgunder FR 52-78' für *VviLAZY1* im Vergleich zum Referenzgenom 'PN40024'

Wissenschaftlicher Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: René Kaiser
Geburtsdatum : Geboren am 10.10. 1988
Geburtsort: in Rostock
Familienstand: ledig, keine Kinder

Wissenschaftlicher Werdegang

- 08/2014 – 03/2019 Wissenschaftlicher Mitarbeiter während des Promotionsstudiums**
- *Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Pflanzengenetik*
- *Thema der Dissertation: „Molekulare Untersuchungen zur Optimierung der Triebhaltung bei der Weinrebe (Vitis vinifera)“*
- 10/2011 – 10/2013 Masterstudent des Studiengangs Funktionelle Pflanzenwissenschaften**
- *Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Agrar- und umweltwissenschaftliche Fakultät*
- *Thema der Masterarbeit am Lehrstuhl für Pflanzengenetik: „Die Allergen Gene fra a1, fra a2 und fra a3 bei rot- und weißfruchtigen Erdbeeren“*
- 10/2008 – 09/2011 Bachelorstudent des Studiengangs Biowissenschaften**
- *Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften*
- *Thema der Bachelorarbeit am Lehrstuhl für Pflanzengenetik: „Mitochondriale Gene bei der Ackerkratzdistel“*

Nebentätigkeiten

- 01/2014 – 06/2014 Studentische Aushilfe**
- *Centogene AG, Abteilung Sanger Sequenzierung, Rostock*
- 10/2013 – 12/2013 Studentische Hilfskraft**
- *Universität Rostock, Institut für Biowissenschaften, Lehrstuhl für Pflanzengenetik*

Rostock, den 06.09.2019...

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Doktorarbeit selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Doktorarbeit angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Doktorarbeit erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis eingehalten.

Ort, Datum

Unterschrift